

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Ingeniería Química

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS A PARTIR DE EXTRACTOS DE RASPO DE UVA



Memoria y Anexos

Autor: Cristina Arenas Ramos
Director: María Martínez Martínez
Co-Director: Joan Josep Roa Rovira
Convocatoria: Septiembre 2017

Resumen

En la actualidad, las nanopartículas son de gran interés científico por su amplia variedad de aplicaciones en diferentes campos. Debido a los grandes avances, las nuevas necesidades y el gran número de nanomateriales utilizados en sectores industriales. En este contexto, existe la necesidad de poder sintetizar dichas partículas de la forma más respetuosa con el medio ambiente.

En el presente trabajo de fin de grado se ha realizado, en primer lugar, la optimización de algunos parámetros involucrados en la preparación del extracto de raspo de uva, que se usará para la síntesis. Una de las variables estudiadas ha sido el tiempo de reflujo, siendo éste variable de 10, 30 ó 60 minutos y la otra ha sido la técnica para separar el sólido remanente en el extracto después de ser filtrado. Se han determinado los polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu y los azúcares reductores por el método de Rebelein de los diferentes extractos obtenidos y se ha observado valores similares para todos ellos, por lo que 10 minutos de reflujo ya se puede considerar suficiente.

En segundo lugar, se ha realizado la síntesis de nanopartículas de plata. Éstas se han preparado de forma sintética (por vía húmeda) utilizando reactivos químicos y también por otra síntesis considerada verde, porque utiliza el extracto de raspo de uva como agente reductor y estabilizante. En esta segunda síntesis se ha analizado cómo influye la cantidad de nitrato de plata añadido mediante espectrofotometría UV-Visible, comprobando que a mayor dosis de plata, mayor cantidad de nanopartículas y además se ha observado un desplazamiento del máximo de absorbancia a longitudes de onda mayores, lo que indica que el tamaño de nanopartícula era mayor.

Por último, se ha caracterizado el extracto de raspo de uva y las nanopartículas de plata utilizando varios tipos de microscopía. Las técnicas empleadas para realizar el estudio han sido microscopía de fuerza atómica (*atomic force microscopy*, AFM), microscopía interferométrica, microscopía electrónica de barrido de alta resolución (*field emission scanning electron microscopy*, FESEM) y de transmisión por barrido (*scanning transmission electrons microscopy*, STEM). Se ha observado que el STEM, es la única técnica avanzada de caracterización que permite caracterizar de una manera precisa el tamaño de las nanopartículas de plata.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis dos tutores, María Martínez y Joan Josep Roa, por hacer que el desarrollo del trabajo de fin de grado sea mucho más fácil, solventando imprevistos y estando disponibles cuando lo necesitaba.

También, a mis compañeros de laboratorio y al grupo SETRI por ayudarme en todo momento, haciendo el trabajo más ameno y enriquecedor.

Por último, y no menos importante, a mis padres, Rafa y Montse, a mi hermana, Laura, y a mi novio, Felipe, por apoyarme en los momentos más duros y darme las fuerzas que necesitaba en la realización del presente trabajo y, en general, en todo el grado.

Glosario

Ag: Plata

Ag(NH₃)₂⁺: Catión diamina-plata (I)

AFM: *Atomic Force Microscopy* (Microscopio de Fuerza Atómica)

BF: *Bright Field* (Campo Claro)

CVD: *Chemical Vapor Deposition* (Deposición de vapor)

DF: *Dark Field* (Campo Oscuro)

EDS: *Energy Dispersive Spectroscopy* (Espectroscopía de Rayos X)

EDX: *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy* (Espectroscopía de Rayos X)

FIB: *Field Ion Beam* (Microscopio de haz de iones focalizados)

NIR: *Near-infrared spectroscopy* (Región espectral del Infrarrojo Cercano)

NSL: *Nanosphere Lithography*

POMs: Polioxometalatos

pvc: *Physical vapor deposition* (Condensación de vapor físico)

FESEM: *Field Emission Scanning Electron Microscope* (Microscopio Electrónico de Barrido de alta resolución)

STEM modificado: *Scanning transmission electron microscope* (Microscopio Electrónico de Transmisión de Barrido)

TEM: *Transmission Electron Microscopy* (Microscopio Electrónico de Transmisión)

UV-vis: Ultravioleta-Visible

Índice

RESUMEN	I
AGRADECIMIENTOS	II
GLOSARIO	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
1. PREFACIO	1
1.1. Origen del proyecto	1
1.2. Motivación	1
2. OBJETIVOS Y ALCANCE DEL PROYECTO	2
2.1. Objetivo General.....	2
2.2. Objetivos Específicos	2
2.3. Alcance del proyecto	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Nanomateriales	3
3.1.1. Nanopartículas metálicas.....	4
3.2. Métodos de síntesis de nanopartículas	6
3.2.1. Top-down	8
3.2.2. Bottom-up.....	10
3.3. Síntesis verde de nanopartículas.....	12
3.3.1. Extracto de raspo de uva	16
4. PARTE EXPERIMENTAL: LABORATORIO	19
4.1. Preparación del extracto de raspo de uva	19
4.1.1. Reactivos y material.....	19
4.1.2. Procedimiento experimental.....	19
4.2. Preparación de nanopartículas de plata	21
4.2.1. Síntesis húmeda	21
4.2.2. Síntesis verde	22
4.3. Determinación de polifenoles	24
4.3.1. Reactivos y material.....	24
4.3.2. Procedimiento experimental.....	24

4.4.	Determinación de azúcares reductores	25
4.4.1.	Reactivos y material	25
4.4.2.	Procedimiento experimental	25
4.5.	Resultados y discusión de la síntesis de nanopartículas de plata y análisis de extractos.....	27
4.5.1.	Determinación de nanopartículas por Espectrometría UV-Visible	27
4.5.2.	Determinación de Polifenoles en extracto de raspo de uva.....	35
4.5.3.	Determinación de azúcares reductores en extracto de raspo de uva.....	39
5.	CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	41
5.1.	Análisis de rugosidad	41
5.2.	Técnicas de caracterización	42
5.2.1.	Microscopía de fuerza atómica (Atomic Force Microscopy, AFM)	42
5.2.2.	Microscopía interferométrica	45
5.2.3.	Microscopía electrónica	46
5.3.	Resultados y discusión	50
5.3.1.	Análisis de rugosidad.....	50
5.3.2.	Microscopía electrónica	55
	CONCLUSIONES	60
	LÍNEAS FUTURAS	61
6.	BIBLIOGRAFÍA	62
	ANEXO	70

Índice de figuras

FIGURA 1 EVOLUCIÓN DEL NÚMERO DE ARTÍCULOS EN DIFERENTES NANOMATERIALES [6].....	5
FIGURA 2 MÉTODOS DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS. (A) “BOTTOM-UP” Y (B) “TOP-DOWN” [13]	6
FIGURA 3 MÉTODOS DE SÍNTESIS SEGÚN LA FASE DE LAS NANOPARTÍCULAS ARRIBA) FASE GAS CENTRO) FASE LÍQUIDA ABAJO) FASE SÓLIDA [14].	7
FIGURA 4 PROCESO DE FOTO-LITOGRAFÍA [17].....	9
FIGURA 5 PROCESO DE IMPRESIÓN POR MICROCONTACTO [20].	9
FIGURA 6 PROCESO DE NANOIMPRESIÓN [21].....	10
FIGURA 7 PROCESO DE DEPOSICIÓN DE VAPOR [29].....	12
FIGURA 8 ESTRUCTURA PARCIAL DE HEPARINA [36].	14
FIGURA 9 RASPO DE UVA [46].	16
FIGURA 10 MECANISMO DE REACCIÓN DEL REACTIVO FOLIN-CIOALTEU [56].....	17
FIGURA 11 ÁCIDO GÁLICO [56].	18
FIGURA 12 MONTAJE DE REFLUJO PARA LA PREPARACIÓN DEL EXTRACTO.	20
FIGURA 13 BAÑO DE AGUA TERMOSTÁTICO.	23
FIGURA 14 PATRONES PARA LA RECTA DE CALIBRADO.	24
FIGURA 15 MUESTRAS PREPARADAS PARA ANALIZAR LOS POLIFENOLES.	25
FIGURA 16 VALORACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES. IZQUIERDA) MUESTRA INICIAL DERECHA) MUESTRA FINAL.	27
FIGURA 17 ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO [68].	28
FIGURA 18 NANOPARTÍCULAS SINTÉTICAS.	29
FIGURA 19 ESPECTRO UV-VIS NANOPARTÍCULAS SINTÉTICAS.....	30
FIGURA 20 NANOPARTÍCULAS EN TIEMPO INICIAL.	30
FIGURA 21 NANOPARTÍCULAS EN TIEMPO FINAL.	31
FIGURA 22 ESPECTROS UV-VIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE AG USANDO EL EXTRACTO 1 (MÉTODO 1).....	31
FIGURA 23 ESPECTROS UV-VIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE AG USANDO EL EXTRACTO 1 (MÉTODO 2).....	32
FIGURA 24 ESPECTROS UV-VIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE AG USANDO EL EXTRACTO 2 (MÉTODO 1).....	32
FIGURA 25 ESPECTROS UV-VIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE AG USANDO EL EXTRACTO 2 (MÉTODO 2).....	32
FIGURA 26 ESPECTROS UV-VIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE AG USANDO EL EXTRACTO 3 (MÉTODO 1).....	33
FIGURA 27 ESPECTROS UV-VIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE AG USANDO EL EXTRACTO 3 (MÉTODO 2).....	33
FIGURA 28 COMPARACIÓN DE CANTIDAD DE NANOPARTÍCULAS AL VARIAR EL EXTRACTO Y CONCENTRACIÓN DE PLATA EN LA SÍNTESIS . ARRIBA) MÉTODO 1 ABAJO) MÉTODO 2.	34
FIGURA 29 RECTA DE CALIBRADO (MÉTODO 1).	36
FIGURA 30 RECTA DE CALIBRADO (MÉTODO 2).	37
FIGURA 31 CONCENTRACIÓN VS. TIEMPO DE CONTACTO (MÉTODO 1).	38
FIGURA 32 CONCENTRACIÓN VS. TIEMPO DE CONTACTO (MÉTODO 2).	38
FIGURA 33 PARÁMETROS DE RUGOSIDAD RA Y RQ [76].	42
FIGURA 34 ESQUEMA DE AFM [79], DONDE 1 LÁSER, 2 ESPEJO, 3 FOTODETECTOR, 4 AMPLIFICADOR, 5 REGISTRO, 6 MUESTRA, 7 PUNTA (SONDA DE BARRIDO) Y 8 CANTILEVER.	43
FIGURA 35 PUNTA AFM [81].	43

FIGURA 36 AFM DIMENSION D3100 (VEECO) [84].	44
FIGURA 37 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA SER OBSERVADA POR AFM.	44
FIGURA 38 PRINCIPIO BÁSICO DE FUNCIONAMIENTO DE LA INTERFEROMETRÍA [86].	45
FIGURA 39 INTERACCIÓN DEL HAZ DE ELECTRONES CON LA MUESTRA [87].	46
FIGURA 40 EMISIONES DE LA MUESTRA EN SEM [88].	46
FIGURA 41 PRINCIPALES COMPONENTES DEL SEM [90].	47
FIGURA 42 SOPORTE STEM [95].	49
FIGURA 43 IMAGEN DE TOPOGRAFÍA (3D) OBTENIDA MEDIANTE AFM PARA EL EXTRACTO 3. IZQUIERDA) MUESTRA BLANCO (3) CENTRO) MUESTRA 1(3) DERECHA) MUESTRA 3(3).	51
FIGURA 44 IMAGEN AFM. IZQUIERDA) MUESTRA BLANCO (3) CENTRO) MUESTRA 1(3) DERECHA) MUESTRA 3(3).	51
FIGURA 45 PERFIL Z DE LA MUESTRA 3(3).	52
FIGURA 46 IMAGEN DE INTERFEROMETRÍA. IZQUIERDA-ARRIBA) MUESTRA BLANCO (3) DERECHA-ARRIBA) MUESTRA 1(3) IZQUIERDA-ABAJO) MUESTRA 3(2) DERECHA-ABAJO) MUESTRA 3(3).	53
FIGURA 47 PERFIL Z DE LA MUESTRA 3(3). DERECHA) PERFIL EN X IZQUIERDA) PERFIL EN Y.	54
FIGURA 48 MICROGRAFÍA OBTENIDA POR FESEM IZQUIERDA) MUESTRA 1(2) CENTRO) MUESTRA 2(2) DERECHA) MUESTRA 3(2).	55
FIGURA 49 MORFOLOGÍA DE LAS NANOPARTÍCULAS EN FESEM.	56
FIGURA 50 ESPECTRO RAYOS X CON MUESTRA DE FESEM.	56
FIGURA 51 ESPECTRO RAYOS X CON MUESTRA DE STEM.	57
FIGURA 52 ESPECTRO DE RAYOS X CON MUESTRA DE STEM.	57
FIGURA 53 IMAGEN DE STEM. IZQUIERDA) MUESTRA 1(1) CENTRO) MUESTRA 1(2) DERECHA) MUESTRA 1(3).	58
FIGURA 54 IMAGEN DE STEM. IZQUIERDA) MUESTRA 3(1) CENTRO) MUESTRA 3(2) DERECHA) MUESTRA 3(3).	58
FIGURA 55 HISTOGRAMA STEM.	58

Índice de tablas

TABLA 1 CLASIFICACIÓN DE LOS NANOMATERIALES SEGÚN SU DIMENSIONALIDAD [5].	4
TABLA 2 CONDICIONES DE TIEMPO DE REFLUJO PARA LA PREPARACIÓN DE EXTRACTO.	20
TABLA 3 CONDICIONES EXPERIMENTALES DE PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA.	23
TABLA 4 FACTOR DE DILUCIÓN. IZQUIERDA) MÉTODO 1 DERECHA) MÉTODO 2.	29
TABLA 5 LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA ABSORBANCIA OBTENIDA PARA LAS DIFERENTES MUESTRAS IZQUIERDA) MÉTODO 1 DERECHA) MÉTODO 2.	35
TABLA 6 ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO (MÉTODO 1).	35
TABLA 7 ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO (MÉTODO 2).	36
TABLA 8 CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES (MÉTODO 1).	37
TABLA 9 CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES (MÉTODO 2).	37
TABLA 10. ERRORES ABSOLUTOS Y RELATIVOS DE LAS MEDIDAS DE POLIFENOLES EN CADA EXTRACTO Y MÉTODO.	39
TABLA 11 VOLUMEN DE TIOSULFATO DE SODIO CONSUMIDO EN LA VALORACIÓN (V_B ES LA CANTIDAD DE TIOSULFATO CONSUMIDA POR EL BLANCO Y V_C POR EL EXTRACTO)	40
TABLA 12 TABLA COMPARATIVA DE LOS VALORES DE R_A DETERMINADOS POR AFM E INTERFEROMETRÍA.	54
TABLA 13 TABLA COMPARATIVA DE LOS VALORES DE RMS DETERMINADOS POR AFM E INTERFEROMETRÍA.	55
TABLA 14 TAMAÑO DE PARTÍCULA STEM.	59

1. Prefacio

1.1. Origen del proyecto

La formación de drenaje ácido de mina, un lixiviado ácido de altas concentraciones de metales tóxicos, producido por la explotación de los yacimientos mineros, provoca grandes problemas ambientales. Por este motivo, entre otros, es importante poder valorizar los residuos generados. Una manera que se ha planteado para valorizar estos residuos metálicos es utilizarlos como reactivos para obtener nanopartículas metálicas. El primer paso es identificar el protocolo más adecuado para realizar dichas síntesis, en la bibliografía se ha encontrado que se han llevado a cabo síntesis de nanopartículas metálicas usando reactivos reductores y estabilizantes. Con el objetivo de poder obtenerlas nanopartículas de la forma menos contaminante, dichos reactivos pueden ser reemplazados por materiales naturales, como residuos vegetales, dando lugar la síntesis verde de nanopartículas.

El presente Trabajo de Fin de Grado forma parte del proyecto de investigación: “Síntesis verde de nanopartículas metálicas a partir de aguas ácidas de mina y extractos de residuos agroalimentarios” (MinNano) desarrollado por la Universitat de Girona (UdG) y la Universitat Politècnica de Catalunya (UPC). Proyecto CTM2015-68859-C2-2-R; MINECO/FEDER.

1.2. Motivación

En la actualidad, las nanopartículas metálicas son de gran interés científico por la amplia variedad de aplicaciones en diferentes campos. Debido a los grandes avances, las nuevas necesidades y el gran número de nanomateriales utilizados en sectores industriales, existe la necesidad de poder sintetizar dichas partículas de la forma más respetuosa con el medio ambiente.

Se ha investigado recientemente el poder reductor y estabilizante de compuestos que contienen las plantas en la síntesis de nanopartículas. Entre otros, algunos de los materiales de origen vegetal utilizados son los extractos concentrados de hojas y plantas verdes, semillas o frutas y verduras.

En este escenario, se ha planteado este proyecto como una investigación sobre la síntesis de nanopartículas metálicas utilizando un extracto natural obtenido a partir del raspo de la uva y su correspondiente caracterización con las técnicas instrumentales de análisis más adecuadas.

2. Objetivos y alcance del proyecto

2.1. Objetivo General

El principal objetivo del presente proyecto final de grado (TFG) es la síntesis verde de nanopartículas metálicas, concretamente, de plata. En dicha síntesis se utilizará extracto de raspo de uva, es decir, la estructura vegetal del racimo como reactivo reductor y disoluciones acuosas de plata.

2.2. Objetivos Específicos

Los objetivos específicos de este TFG, son los siguientes:

- Determinar cómo influye el tiempo de reflujo y posterior separación del extracto del de raspo de uva usado en la síntesis de nanopartículas de plata, en la concentración de polifenoles y de azúcares reductores.
- Realizar síntesis de nanopartículas de plata mediante la adición de disolución de Ag^+ a un volumen constante del extracto previamente obtenido para determinar la influencia tanto del extracto como de la cantidad de plata en la concentración, morfología y tamaño de las nanopartículas obtenidas.
- Identificar la técnica microscópica más adecuada para caracterizar las nanopartículas de plata sintetizadas

2.3. Alcance del proyecto

En el presente TFG, se ha planteado la obtención de nanopartículas por medio de la vía verde y su posterior caracterización mediante técnicas avanzadas microscópicas de caracterización. El fin de éste ha sido elaborar un protocolo de síntesis verde a partir del extracto de un residuo vegetal, como es el raspo de uva.

Además, se han investigado diferentes técnicas microscópicas para seleccionar cuál es más adecuada para caracterizar y determinar el tamaño y distribución de las nanopartículas sintetizadas.

3. Introducción

3.1. Nanomateriales

La nanotecnología es la ciencia que estudia la manipulación de materiales a escala nanométrica, es decir, en el rango de 1 a 100 nm. Puede usarse en muchos campos científicos como química, física, ciencia de los materiales e ingeniería, teniendo así aplicaciones en medicina, bienes de consumo, comunicación, informática, energía, agricultura, tratamiento de agua e industria aeroespacial entre otras [1]. El tamaño tan pequeño de estos materiales les aporta propiedades únicas y éstas pueden ser controladas según la estructura y composición en la nanoescala [2].

Los nanomateriales son definidos como una sustancia o materiales químicos que se utilizan y fabrican a una escala muy reducida. Éstos se desarrollan para exhibir características como mayor resistencia, reactividad química o conductividad en comparación con el mismo material a otras escalas mayores [3]. Este hecho es principalmente debido a su estructura y la mayor relación entre el área superficial y el volumen.

Los nanomateriales pueden estar presentes en la formación de partículas, tubos, barras o fibras [2]. Sin embargo, éstos pueden presentar un riesgo para el medio ambiente y plantear problemas de salud y seguridad. Los métodos existentes de evaluación del riesgo son generalmente aplicables a los nanomateriales, pero necesitan más desarrollo en aspectos más específicos. Los riesgos más altos provienen de nanopartículas libres e insolubles dispersas en un líquido o polvo. Su riesgo requiere un examen del tamaño de partícula, área de superficie, estabilidad, propiedades de la superficie, solubilidad y reactividad química [4].

Los nanomateriales pueden ser clasificados según la dimensionalidad de la nanoestructura. Tal y como se muestra en la **Tabla 1**, éstos pueden ser nanopartículas (objetos donde todas las dimensiones espaciales son nanométricas), nanocables (objetos que se alargan en la mesoescala en una dirección espacial pero con una sección transversal nanométrica) y superficies delgadas (superficies constituidas por unas pocas capas atómicas de espesor) tales como revestimientos o películas.

Tabla 1 Clasificación de los nanomateriales según su dimensionalidad [5].

Nanotecnología			
Nanomateriales			Tecnologías de nanofabricación
Dimensionalidad de nanoestructuras			
Cero	Una	Dos	
Nanopartículas: <ul style="list-style-type: none">- Metal noble- Puntos cuánticos semiconductores- Poliméricas	Nanocables: <ul style="list-style-type: none">- Metal- Óxido de metal- Calcogenuros metálicos- Semiconductor- Nanotubos de carbono	Nanopelículas: <ul style="list-style-type: none">- Multicapas metálicas- Grafeo- Nanopelículas inorgánicas- Dicalcogenuros de metales de transición	
			Top-down: <ul style="list-style-type: none">- Litografía Bottom- up: <ul style="list-style-type: none">- Solución-líquido-sólido- Deposición de vapor- Vapor-líquido-sólido- Nucleación- Autoensamblaje

Concretamente, en el estudio realizado en este TFG, la dimensión de la nanoestructura es cero, es decir, son nanopartículas y, aún más específicamente, metálicas.

3.1.1. Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas son agregados ultrafinos de materia que van desde pocos hasta cientos de nm. Pueden ser amorfos o cristalinos con propiedades conductoras o aislantes dependiendo de su composición. Los materiales típicos incluyen metales u óxidos metálicos, semiconductores o polímeros con hasta el 90 % de los átomos totales que constituyen la superficie. Por lo tanto, casi todas las nanopartículas pueden participar tanto en reacciones físicas como químicas, lo que explica su cinética de reacción rápida [5].

La **Figura 1** muestra el número de artículos en los que aparecen varios nanomateriales desde el 2004 hasta 2013. Como se observa, las nanopartículas han sido el nanomaterial más estudiado con diferencia muy significativa. Después de ésta se encuentran los nanotubos, nanocristales y nanocompuestos, respectivamente [6].

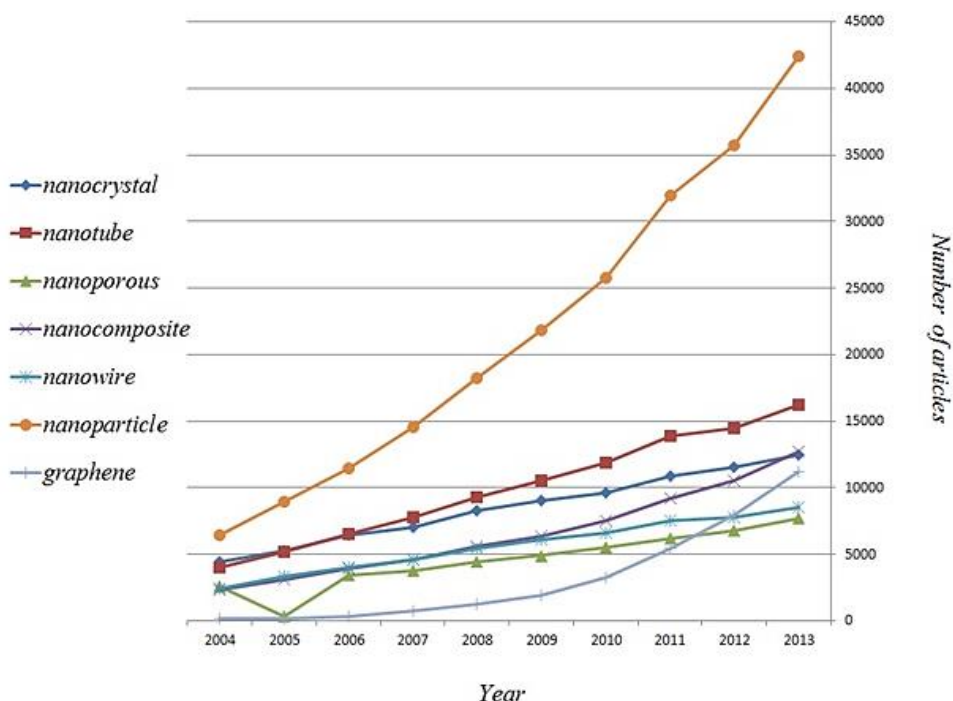


Figura 1 Evolución del número de artículos en diferentes nanomateriales [6].

Este gran interés puede ser debido a que éstas son consideradas uno de los “building blocks” más importantes para construir sistemas organizados a escala nano [7]. También, tienen un proceso de síntesis altamente reproducible, fácil, sin agentes surfactantes y un control relativamente fácil de su tamaño. Otro punto importante es el almacenaje de las nanopartículas ya que pueden permanecer durante meses en un desecador sin ningún deterioro en su morfología, y así, utilizarlas cuando sea necesario [8].

Concretamente, las nanopartículas metálicas han atraído mucha atención en la última década por su alta actividad química y especificidad en la interacción. Su número de publicaciones ha aumentado casi exponencialmente en los últimos años, lo cual no es de extrañar por las sobresalientes características que presentan [9]. En general, éstas pueden prepararse y estabilizarse mediante métodos químicos, físicos y biológicos. Ejemplos de enfoque químico pueden ser la reducción química, técnicas electroquímicas, reducción fotoquímica y la pirolisis y en cuanto al enfoque físico la descarga de arco y la condensación de vapor físico (*Physical vapor deposition*, pvc) [10]. Este tipo de partículas exhiben propiedades ópticas, térmicas, químicas y físicas inusuales que se deben a una alta proporción de átomos con superficie de alta energía en comparación con el sólido en escala macro [8].

Aplicaciones de las nanopartículas metálicas

Como se ha dicho anteriormente, las nanopartículas tienen aplicaciones en gran variedad de campos. Concretamente, las metálicas tienen aplicaciones posibles en diversas áreas, tales como electrónica, cosméticos, revestimientos, envases y biotecnología. Por ejemplo, las nanopartículas se pueden introducir en un sólido a temperaturas relativamente más bajas, a menudo sin fundir, dando lugar a recubrimientos mejorados y fáciles de crear para aplicaciones electrónicas como condensadores. Otro uso es en cosméticos, revestimientos y envases ya que como poseen una longitud de onda por debajo de la longitud de onda crítica de la luz, son transparentes [11].

Actualmente, existen un gran número de investigaciones por su aplicación medioambiental, como puede ser en el desarrollo de técnicas de detección y monitorización mucho más sensibles que las actuales. Un posible caso es la personalización de sensores utilizando nanopartículas, obteniendo así una optimización de la señal que emite el electrodo, transformándolo para detectar de manera más eficaz los iones de interés [12].

3.2. Métodos de síntesis de nanopartículas

La síntesis de nanopartículas se lleva a cabo a partir de dos técnicas totalmente opuestas, las cuales son “bottom-up” y “top-down”. Como muestra la **Figura 2**, en el primer caso se produce nanomateriales partiendo del nivel atómico, en cambio, la segunda consigue una disminución del tamaño del material, consiguiendo así materiales a nanoescala [10].

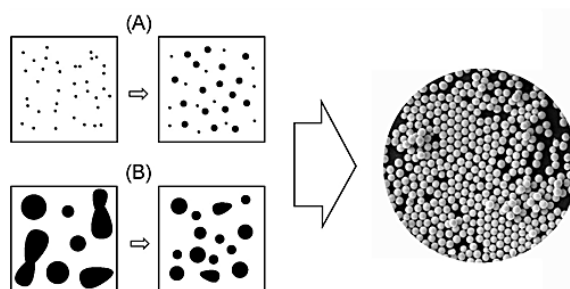


Figura 2 Métodos de síntesis de nanopartículas. (A) “Bottom-up” y (B) “Top-down” [13].

Más concretamente, los métodos de producción se pueden clasificar de diferentes maneras. Tal y como se observa en la **Figura 3**, existen tres categorías según la fase en la que se encuentran las nanopartículas, es decir, producción en fase vapor, fase líquida y fase sólida.

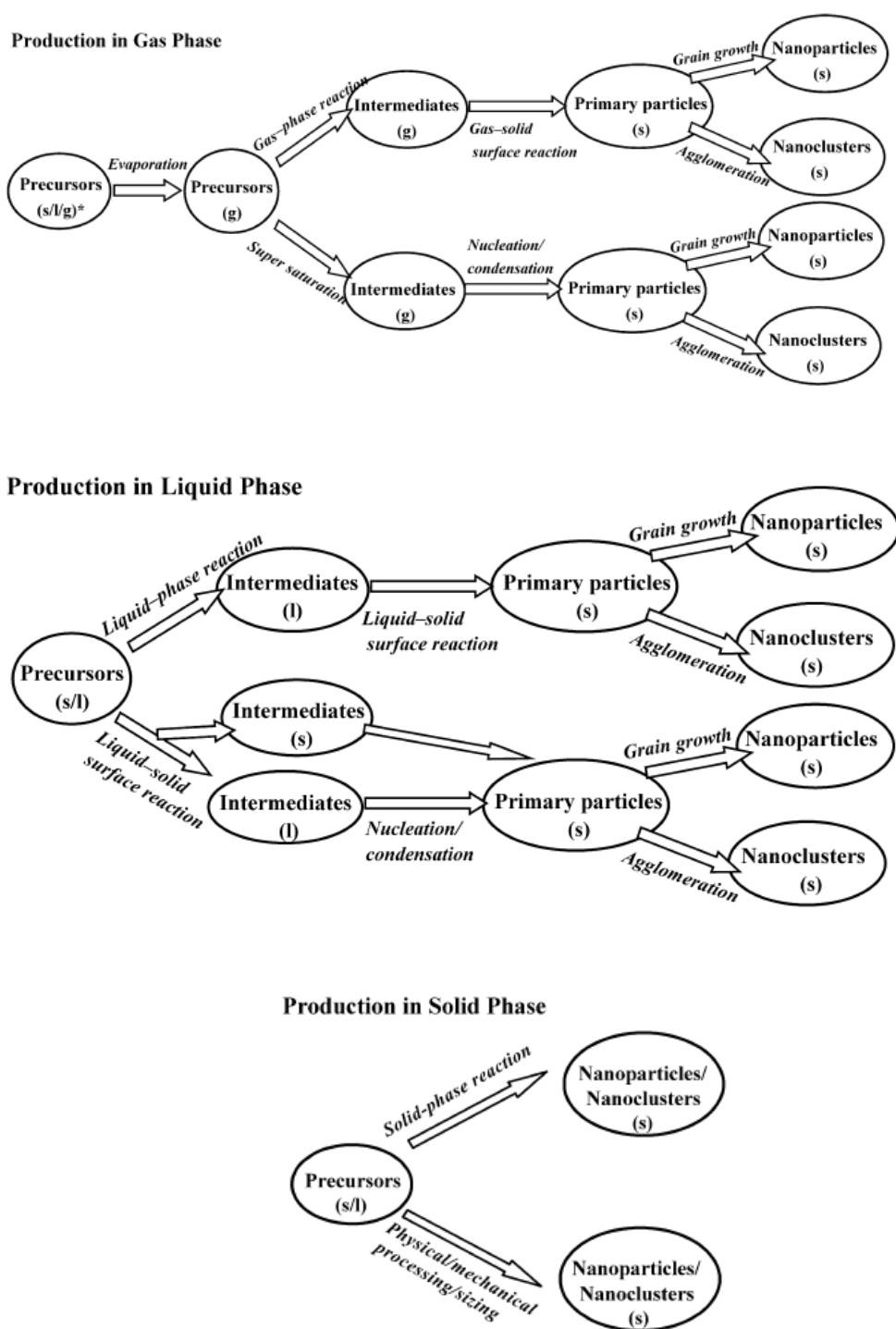


Figura 3 Métodos de síntesis según la fase de las nanopartículas arriba) Fase gas centro) fase líquida abajo) fase sólida [14].

La producción de nanopartículas en fase vapor se lleva a cabo a menudo a altas temperaturas y en el vacío, como la descarga de arco en gas, o a presión atmosférica, como la descarga de arco en líquido, pirolisis y disposición química en fase vapor.

La formación de nanopartículas en fase líquida sigue una ruta química húmeda. Existen métodos para controlar el tipo, forma y tamaño de nanopartículas, los cuales son el solvotérmico, el sol-gel, el basado en plantillas y el método micela/microemulsión.

Por último, la síntesis de nanopartículas en fase sólida ha sido desarrollada recientemente. Es denominada método mecanicoquímico y la tipología más usada, generalmente, emplea un procedimiento de molienda [14].

3.2.1. Top-down

La técnica top-down utiliza formas mecánicas, químicas u otras formas de energía para descomponer los materiales macroestructurados en componentes más pequeños [15]. Entre otros, el mayor problema de esta tipología es la imperfección de la estructura superficial ya que puede causar daño cristalográfico o incluso defectos adicionales durante las etapas de ataque químico. Dichas imperfecciones tendrían un impacto significativo en las propiedades físicas y químicas superficiales por la relación superficie-volumen [16].

Los principales procesos son los siguientes:

- **Foto-litografía:**

El proceso consiste en producir una máscara que lleva la información de patrón requerida y posteriormente transferir ese patrón, usando alguna técnica óptica en un polímero fotoactivo o fotorresistente. Existen dos enfoques fotolitográficos básicos, los cuales son la impresión en sombra, que se puede dividir en impresión de contacto e impresión de proximidad, e impresión de proyección.

La **Figura 4** muestra una representación esquemática del procedimiento, en el cual se aplica un recubrimiento delgado sobre una base y se expone a continuación a una máscara, de modo que la luz choque con las áreas seleccionadas del material. Según la naturaleza química del material superior, se obtendrá una imagen de tono positivo o negativo de la máscara. Las áreas que quedan después de los procesos descritos, se usan para enmascarar el sustrato subyacente, para un posterior ataque químico u otras etapas. Después del proceso de ataque químico, la resistencia se elimina por separación para producir una imagen en relieve de tono positivo o negativo en el sustrato subyacente.

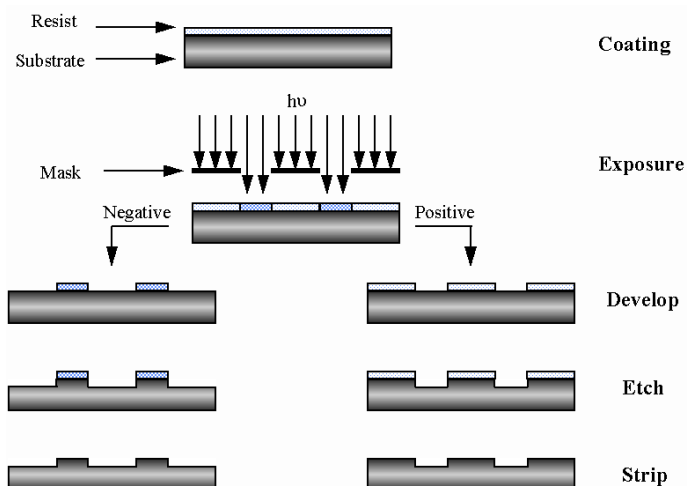


Figura 4 Proceso de foto-litografía [17].

- **Litografía por irradiación de electrones:**

La litografía de haz de electrones consiste en la irradiación de electrones de una superficie que está cubierta con una resistencia sensible a electrones por medio de un haz de electrones enfocado [18].

- **Impresión por microcontacto (Microcontact printing):**

En este método, se utiliza un sello elastomérico con características de bajo relieve para transferir un material "entintado" sobre un sustrato [19]. La **Figura 5** muestra el proceso de impresión.

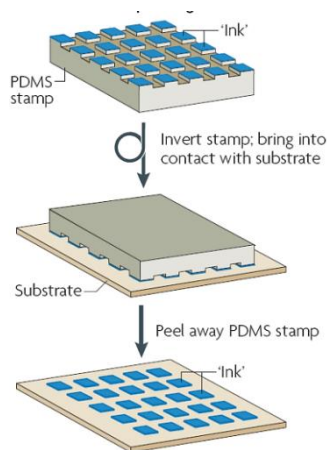


Figura 5 Proceso de impresión por microcontacto [20].

La litografía de nanoimpresión tiene dos pasos básicos como se muestra en la **Figura 6**. La primera es la etapa de impresión en la que un molde con nanoestructuras en su superficie es prensado sobre una capa delgada situada en un sustrato, seguido por la eliminación del molde. La segunda etapa es la transferencia de patrones para eliminar la resistencia residual en la zona comprimida [21].

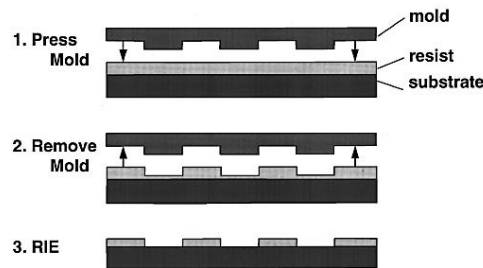


Figura 6 Proceso de nanoimpresión [21].

- **Nanosphere lithography (NSL):**

La NSL es una herramienta de fabricación barata para producir matrices regulares y homogéneas de nanopartículas de diferentes tamaños. Este método combina las ventajas de los enfoques “top-down” y “bottom-up” [22].

3.2.2. Bottom-up

La técnica “bottom-up” utiliza conjuntos de unidades básicas de la materia para formar unidades más grandes de buena calidad. [18] La síntesis de grandes moléculas es un típico enfoque “bottom-up”, en el que los “building blocks” (monómeros) son ensamblados formando una gran molécula o polimerizados en material a granel. Otro enfoque puede ser el del crecimiento de cristales, donde especies como átomos, iones o moléculas se unen ordenadamente dando lugar a una estructura cristalina deseada [16].

Los principales procesos son los siguientes:

- **Autoensamblaje:**

El autoensamblaje es la asociación espontánea de un conjunto de moléculas en una o más estructuras supramoleculares, impulsadas por múltiples interacciones no covalentes. Estas interacciones incluyen enlaces de hidrógeno, atracción electrostática y fuerzas de Van der Waals, y a menudo están controladas por el efecto hidrófobo [23].

En este procedimiento, la estructura final deseada es "codificada" en la forma y propiedades de las moléculas que se utilizan, en comparación con las técnicas tradicionales, como la litografía, donde la estructura final deseada debe ser tallada a partir de un bloque más grande.

En una escala molecular, la aplicación precisa y controlada de fuerzas intermoleculares puede conducir a nuevas y previamente inalcanzables nanoestructuras. Las ensamblas biomoleculares son sofisticadas y a menudo difíciles de aislar, haciendo muy difícil el análisis sistemático y progresivo de su ciencia fundamental [24].

- **Síntesis química húmeda:**

La síntesis húmeda comprende todas aquellas rutas que involucren el uso de disoluciones. El método químico es relativamente barato, no tóxico, en el que se invierte relativamente poco tiempo, muy simple ya que contiene pocas sustancias químicas y no requieren sofisticados instrumentos costosos [25].

- **Microemulsión:**

El método de microemulsión es una de las técnicas de preparación más versátil que permite controlar las propiedades de las partículas tales como tamaño, geometría, morfología, homogeneidad y superficie.

Las microemulsiones son isotrópicas, macroscópicamente homogéneas y termodinámicamente estables y contienen al menos tres componentes, los cuales son una fase polar (usualmente agua), una fase no polar (usualmente aceite) y un surfactante [26].

- **Sol-gel:**

El proceso sol-gel es una técnica química húmeda ampliamente utilizada en los campos de la ciencia de los materiales y la ingeniería cerámica. Éste método se utiliza principalmente para la fabricación de materiales partiendo de una solución química (sol) que actúa como precursor de una red integrada (o gel) de partículas discretas [27].

La técnica se utiliza para la fabricación de nanocristales utilizados para formar una fina película como recubrimiento y en materiales de vidrio [28].

- **Deposición de vapor (chemical vapor deposition, CVD):**

La CVD (chemical vapor deposition) es una herramienta básica de fabricación y es fundamental para la producción de gran parte de la electrónica actual. También es una técnica sujeta a un refinamiento y una expansión constante, empujando la investigación de materiales en nuevas direcciones.

El proceso consta de los pasos siguientes:

- El material a recubrir, se coloca dentro de una cámara de vacío.
- Se calienta el material de recubrimiento o se reduce la presión alrededor de éste hasta que el material se vaporice, ya sea dentro de la cámara de vacío o en una zona adyacente desde la cual pueda introducirse el vapor. Allí, el material suspendido comienza a depositarse sobre el material de sustrato y forma un revestimiento uniforme.
- Por último, ajustando la temperatura y la duración del proceso se puede controlar el espesor del recubrimiento.

La **Figura 7** muestra el proceso de deposición de vapor, el cual comienza con tanques que contienen un material iniciador (rojo) y uno o más monómeros (púrpura y azul), que son los “building blocks” del revestimiento polimérico deseado. Éstos se vaporizan y se introducen en una cámara de vacío que contiene el material a recubrir. El iniciador ayuda a acelerar el proceso en el que los monómeros se enlazan en cadenas para formar polímeros sobre la superficie del material de sustrato [29] [30].

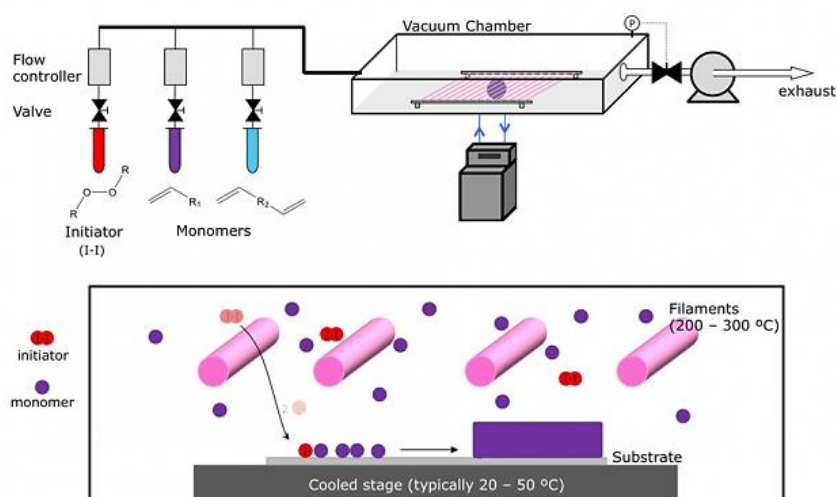


Figura 7 Proceso de deposición de vapor [29].

3.3. Síntesis verde de nanopartículas

La síntesis de nuevas nanopartículas basadas en el concepto de nanotecnología verde está ganando adeptos durante los últimos años. La necesidad de biosíntesis de nanopartículas aumentó a medida que los procesos físicos y químicos eran más costosos. A menudo, la producción de nanopartículas a partir de un método sintético puede conducir a la presencia de productos tóxicos en la superficie de

éstas, pudiendo tener efectos adversos en las aplicaciones médicas. Esto no es un problema cuando se trata de nanopartículas biosintéticas.

En la búsqueda de vías más baratas para la síntesis de nanopartículas, científicos utilizaron enzimas microbianas y extractos de plantas (fitoquímicos), los cuales, con sus propiedades antioxidantes o reductoras, suelen ser responsables de la reducción de compuestos metálicos en sus respectivas nanopartículas. Por lo tanto, este tipo de síntesis se puede considerar una variante de la explicada en el **apartado 3.2.** (concretamente la síntesis por vía húmeda) pero sin el uso de reactivos químicos. La síntesis verde proporciona un avance sobre el método químico y físico, ya que es más rentable, amigable con el medio ambiente, fácilmente ampliado para la síntesis a gran escala y no hay necesidad de utilizar alta presión, energía, temperatura y productos químicos tóxicos [31].

Existen diferentes métodos verdes como: el biológico, polisacárido, Tollens, de irradiación y polioxometalatos de valencia mixta.

- **Método biológico:**

El método biológico utiliza un extracto producido a partir de microorganismos vivos, los cuales pueden actuar tanto como agentes reductores como de recubrimiento. En la síntesis, el proceso de reducción de iones por biomoléculas, tales como, enzimas/proteínas, aminoácidos, polisacáridos y vitaminas es respetuoso con el medio ambiente. Dicha técnica puede ser dividida en dos categorías dependiendo del lugar donde se crean las nanopartículas, ya que muchos microorganismos reducen materiales inorgánicos intra- o extracelularmente [32].

Aunque los métodos biológicos se consideran seguros, rentables, sostenibles y ambientalmente benignos, tienen algunos inconvenientes en el cultivo de los microorganismos, como el elevado tiempo requerido y la dificultad en tener un buen control en la distribución del tamaño, la forma y la cristalinidad de la nanopartícula. A pesar de eso, la óptima selección de la cepa, la optimización de las condiciones tales como el pH, la temperatura de incubación y el tiempo, la concentración de iones metálicos y la cantidad de material biológico, ha llegado a dar esperanza en la aplicación de estos enfoques a gran escala. También, existen las posibilidades de producir microbios genéticamente modificados que contengan agentes reductores específicos y, por tanto, controlan el tamaño y la forma de las nanopartículas sintetizadas.

Las interacciones entre los metales y los microbios han sido explotados para diversas aplicaciones biológicas en los campos de la biorremediación, la biomineralización, la biolixiviación, y biocorrosión y la síntesis microbiana de nanopartículas se ha convertido en un campo de investigación prometedora [33].

- Método polisacárido:

Los polisacáridos son polímeros derivados de los monosacáridos. En la naturaleza, éstos pueden tener origen en algas, vegetales, microorganismos y animales. Existe gran diversidad de polisacáridos ya que tienen un gran número de grupos reactivos, una amplia gama de peso molecular y una composición química variable [34].

Dicho método consiste en obtener nanopartículas utilizando polisacáridos como agentes reductores y estabilizadores [35]. La reacción se realiza en agua, ya que se considera como un sistema solvente ambientalmente benigno [32].

Concretamente, en el caso de las nanopartículas de plata, uno de los polisacáridos que se utiliza es la heparina por su propiedad aniónica. La **Figura 8** muestra una estructura parcial de heparina [35].

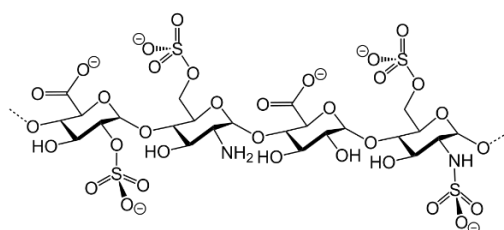
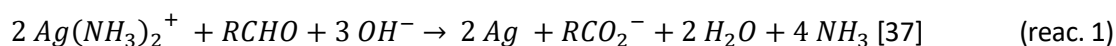


Figura 8 Estructura parcial de heparina [36].

Otro ejemplo de síntesis puede ser utilizando almidón, donde la α -D-glucosa actúa como agente reductor en un sistema a temperaturas intermedias. El almidón en la mezcla se utiliza para prevenir el crecimiento de las partículas y también evitar el uso de disolventes orgánicos relativamente tóxicos. Además, la unión entre el almidón y las nanopartículas es débil y pueden ser separados a temperaturas más altas, permitiendo la fácil obtención de éstas [32].

- Método Tollens:

El método de Tollens es un proceso simple que permite obtener nanopartículas, con un tamaño controlado, en un solo paso. Esta técnica de síntesis verde implica la reducción de $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$, reactivo de Tollens, por un aldehído, tal y como se puede ver en la siguiente reacción.



En el procedimiento de Tollens modificado, los iones de plata se reducen por sacáridos en presencia de amoníaco, produciendo películas de nanopartículas de plata (50-200 nm), hidrosoles de plata (20-50 nm) y nanopartículas de plata de diferentes formas. En este método, la concentración de amoníaco y la naturaleza del agente reductor desempeñan un papel importante en el control del tamaño y la morfología de las nanopartículas [38].

- **Método de irradiación:**

La técnica de irradiación con microondas produce nanopartículas con una muy baja dispersión de tamaño, aunque no siempre se logra un control preciso en la morfología. Las microondas actúan como campos eléctricos de alta frecuencia, capaces de calentar cualquier material conteniendo cargas eléctricas, haciendo que pierdan energía [39].

Las sustancias utilizadas deben absorber la irradiación y ser capaces de transformar la energía electromagnética en calórica, dando por resultado productos de tamaño nanométrico [40]. Éste es un método rápido, uniforme y efectivo, que permite incrementar las cinéticas de reacción en uno o dos órdenes de magnitud [39].

Existen varias formas de irradiación como pueden ser por microondas y por láser, entre otras. El método de irradiación con láser produce nanopartículas de forma y tamaño bien definidos. Por ejemplo, la irradiación con láser de una solución acuosa de tensioactivo que contiene sal de plata puede producir nanopartículas de plata. El tamaño de éstas se puede alterar por la modulación de la energía del láser; una potencia de láser baja con tiempos de irradiación cortos puede dar nanopartículas de plata de tamaño menor a 20 nm, mientras que el aumento de la potencia de irradiación reduce aún más las dimensiones de nanopartículas obteniendo tamaños menores de 5 nm [32].

- **Método de polioxometalatos (POMs):**

Los polioxometalatos son fragmentos discretos de óxidos metálicos de forma y tamaño bien definidos, solubles en agua y capaces de someterse a reacciones redox sin modificar su estructura [40]. Los POMs destacan por su versatilidad química, estructural y electrónica y actúan como reductores, fotocatalizadores, y estabilizadores [41] [42].

Estos agregados inorgánicos se utilizan en la síntesis de nanopartículas puesto que presentan las siguientes ventajas:

- es posible sintetizarlos en la forma reducida
- son altamente solubles en agua y es previsible que también lo son en disolventes no acuosos
- las formas reducida y oxidada son simultáneamente estables si el pH es elevado
- varios de ellos pueden actuar en agua pura sin ningún aditivo
- proporcionan simultáneamente una capacidad de reducción y estabilización [43].

En concreto, las nanopartículas de plata se sintetizan a partir de soluciones acuosas de sales de plata con POMs y varían según el tipo de polioxometalato utilizado. En general, se obtienen nanopartículas esféricas con diámetro de 38 nm [41].

En este trabajo de fin de grado se ha utilizado el método biológico para sintetizar las nanopartículas de plata. Para ello, se ha utilizado extracto de raspo de uva como agente reductor y estabilizante.

3.3.1. Extracto de raspo de uva

El raspo de uva, **Figura 9**, es un residuo vegetal de la industria vitivinícola, el cual se genera en el proceso del despalillado de los racimos y representa entre el 2,5 y 7,5% del peso en las uvas [44]. Las cooperativas normalmente queman este residuo y aunque en ocasiones se destina a la producción de abonos, no es lo habitual [45].



Figura 9 Raspo de uva [46].

Este producto de desecho tiene un alto grado de fibras (lignina y celulosa) y un alto porcentaje de elementos minerales nutritivos, especialmente nitrógeno y potasio [47]. También, los tallos contienen cantidades significativas de compuestos polifenólicos, especialmente ácidos fenólicos, flavanoles y flavanonoles como la astilbina. Estos compuestos son responsables de muchas propiedades de frutas, jugos y bebidas fermentadas tales como color, amargura y astringencia [48].

La utilización de los subproductos vinícolas está ganando cada vez más atención debido a sus prometedoras aplicaciones finales. Uno de sus usos es la eliminación de metales pesados contaminantes de aguas residuales industriales, debido a su buena capacidad de sorción de éstos. Por ejemplo, se ha comprobado que el raspo tiene más capacidad de retener metal que el carbón activo tanto granular como en polvo [49]. También se ha investigado que los tallos de uva mezclados con lodos de EDAR o lodos de molinos de oliva producen un compost con buen valor agronómico [44]. Por último, otra posible aplicación que está bajo intensa exploración es su utilización en la síntesis de nanopartículas, la cual es empleada en el presente trabajo [50].

El uso del raspo de uva para sintetizar nanopartículas de metales nobles, como oro o plata, es posible ya que se ha demostrado que los polifenoles que contiene juegan un papel clave en este proceso, puesto que son buenos agentes reductores y estabilizantes [51].

3.3.1.1. Polifenoles

Los polifenoles son compuestos originados principalmente en las plantas y son caracterizados por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. En función del número de anillos y los elementos estructurales presentes, los polifenoles se clasifican principalmente en ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides [52].

Como se ha comentado, estos tipos de compuestos tienen un gran poder reductor de iones metálicos [53]. Recientemente, se han utilizado polifenoles como ligandos estabilizadores o ligandos de coordinación para la síntesis de nanopartículas de metal sólido y redes metal-fenólicas [54]. Los componentes de poliol y los componentes heterocíclicos solubles en agua se encontraron principalmente responsables de la reducción de iones de plata o cloroaurato y la estabilización de las nanopartículas, respectivamente [55].

Uno de los métodos más utilizados para el análisis de compuestos fenólicos totales es el de Folin-Ciocalteu. Éste se basa en que los polifenoles reaccionan, en medio básico, con el reactivo Folin-Ciocalteu dando lugar a una coloración azul, la cual puede ser determinada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 765 nm. El reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido formado por las dos sales en el medio ácido (ácido fosfomolibdotúngstico), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para determinar el contenido de polifenoles, tal y como muestra la **Figura 10** [56].

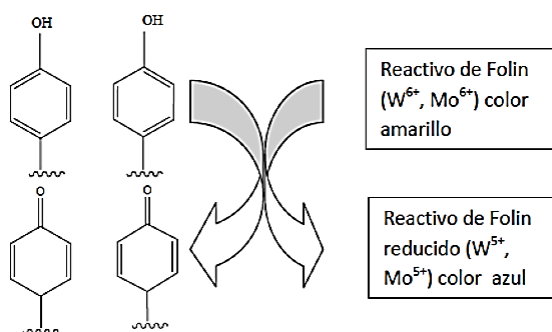


Figura 10 Mecanismo de reacción del reactivo Folin-Ciocalteu [56].

El ácido gálico, **Figura 11**, se utiliza como equivalente de contenido de polifenoles. Dado que el ensayo mide todos los compuestos fenólicos, la elección de ácido gálico como estándar se basa en la disponibilidad de una sustancia estable y pura. Además, la respuesta del ácido gálico se ha demostrado que es equivalente a la mayoría de los compuestos fenólicos en el raspo sobre una base de masa. También se ha probado la estabilidad de las disoluciones de ácido gálico estándar, las cuales pierden

menos del 5% de su valor en más de dos semanas si se refrigera y se mantiene bien cerrado [57]. Además, es barato, soluble en agua, se puede recrystalizar y secar fácilmente y es estable en la forma seca [58].

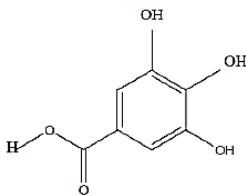


Figura 11 Ácido gálico [56].

4. Parte experimental: Laboratorio

4.1. Preparación del extracto de raspo de uva

4.1.1. Reactivos y material

Los reactivos utilizados son los siguientes:

- Raspo de uva de Subirats (Alt Penedès) de la cosecha de 2014.

El material e instrumentación utilizado es el siguiente:

- Ultrasonidos Selecta.
- Tamizadora y tamices Filtra de 1; 0,8; 0,5 y 0,35 milímetros.
- Matraz de fondo redondo de capacidad de 500 mililitros.
- Condensador.
- Termómetro.
- Manta calefactora Fibroman-C.
- Embudo Büchner y papel de filtro Whatman No.1.
- Centrífuga Centronic-bl II.
- Jeringa de 20 ml Norm-Ject.
- Filtros de 0,2 µm Agilent.
- Estufa.
- Molinillo Waring Commercial.

4.1.2. Procedimiento experimental

Antes de obtener el extracto se procede a la preparación del raspo de uva. La primera etapa del tratamiento es el desbrozado, donde se elimina a mano los restos de uva y hojas. A continuación, se realiza la limpieza del raspo, el cual consiste en tres lavados manuales con agua destilada. Después de los lavados manuales se debe dejar reposar el raspo durante 24 h para poder hacer el último con ultrasonidos, el cual, posteriormente, se introduce en una estufa a 110 °C durante 24 h. Una vez seco, el raspo se muele durante varios segundos para disminuir el tamaño de los trozos del raspo. Por último, se introduce el raspo molido en una tamizadora para preparar diferentes fracciones, de tamaños de diámetro 1; 0,8; 0,5 y 0,35 mm [59]. En este proyecto se utiliza el raspo de un tamaño fijo, comprendido entre 1 y 0,8 mm, ya que al ser un tamaño grande es más fácil manipular.

El proceso de extracción se hace mediante reflujo. Para ello se mezclan 3 gr de extracto tamizado y 100 mL de agua Milli-Q en un matraz de fondo redondo. Sobre éste se coloca el condensador para perder la mínima cantidad de disolvente. El montaje, el cual se muestra en la **Figura 12**, se coloca sobre una manta calefactora y se deja en reflujo durante un tiempo determinado.



Figura 12 Montaje de reflujo para la preparación del extracto.

En el presente proyecto la temperatura de la mezcla se ha fijado a 100°C y se ha estudiado cómo puede influir en la extracción el tiempo de contacto, tal y como se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2 Condiciones de tiempo de reflujo para la preparación de extracto.

Extracto	Tamaño extracto(mm)	Tiempo (min)
1	$1 < \phi < 0,8$	10
2	$1 < \phi < 0,8$	30
3	$1 < \phi < 0,8$	60

Una vez acabada la operación de reflujo, se separa el sólido y el sobrenadante obtenido mediante filtración con un embudo Büchner y vacío. Seguidamente, para garantizar la mayor eliminación del residuo de raspó, se centrifuga el extracto obtenido a 5000 r.p.m. durante 10 minutos o se filtra mediante una jeringa con filtro de 0,2 μm . En este estudio se han realizado ambos procedimientos, siendo el método 1 el centrifugado y método 2 el filtrado. Por último, el sobrenadante se enrasa a 100 mL para obtener el mismo volumen en todos los extractos.

El extracto se mantiene en el frigorífico a 4°C aproximadamente para posteriores análisis y procedimientos experimentales [60].

4.2. Preparación de nanopartículas de plata

Como se ha explicado en apartados anteriores, existen gran variedad de formas de preparación de nanopartículas de plata. En el presente trabajo primero se han realizado de forma sintética (vía húmeda) como experimento previo para comparar el tipo de síntesis para posteriormente realizar una vía verde, que es la que nos interesa, por lo cual, ha sido estudiada más profundamente.

4.2.1. Síntesis húmeda

El procedimiento experimental seguido se divide en dos etapas. En una primera se han creado las semillas de plata, las cuales se utilizan en la etapa siguiente para provocar el crecimiento de nanoprismas de plata.

4.2.1.1. Reactivos y material

Los reactivos utilizados para formar las semillas de plata son los siguientes:

- Citrato trisódico acuoso 2,5 mM de Sigma-Aldrich.
- Ácido poliestirensulfónico de sodio 500 mg/L de Sigma-Aldrich.
- Borohidruro de sodio 10 mM de PanReac, recién preparado.
- Nitrato de plata acuoso 0,5 mM de Sigma-Aldrich.

Los reactivos utilizados para el crecimiento de los nanoprismas de plata son los siguientes:

- Ácido ascórbico acuoso 10 mM de Scharlau.
- Solución de semillas de plata.
- Nitrato de plata acuoso 0,5 mM de Sigma-Aldrich.
- Citrato trisódico acuoso 25 mM de Sigma-Aldrich.

Todos los reactivos son de grado analítico. Las disoluciones se han preparado a partir de pesada directa del sólido.

El material e instrumentación empleado es el siguiente:

- Jeringa de 20 mL Norm-Ject.
- Bomba de jeringa Kd Scientific, modelo KDS 510.
- Agitador Selecta.

4.2.1.2. Procedimiento experimental

Las semillas se preparan mezclando en un vaso de precipitado 5 mL de ácido ascórbico acuoso, 0,25 mL de ácido poliestirensulfónico de sodio y 0,3 mL de borohidruro de sodio. Posteriormente, se agrega mediante una bomba de jeringa 5 mL de nitrato de plata a una velocidad de 2 mL/min, mientras se agita continuamente [61].

Los nanoprismas se producen combinando, en un vaso de precipitado, 5 mL de agua destilada, 75 mL de ácido ascórbico acuoso y diferentes cantidades de la disolución de semillas de plata. Seguidamente, se agregan 3 mL de nitrato de plata a una velocidad de 1 mL/min. Después de la síntesis, para estabilizar las partículas se añade 0,5 mL de citrato trisódico acuoso 25 mM y se diluye en agua Milli-Q como se desee [62].

4.2.2. Síntesis verde

4.2.2.1. Reactivos y material

Los reactivos utilizados son los siguientes:

- Nitrato de plata 0,01 M de Sigma-Aldrich (grado ACS). La disolución se ha preparado a partir de pesada directa del sólido.
- Extracto de raspo previamente obtenido.

El material e instrumentación utilizado es el siguiente:

- Tubos de ensayo de vidrio de capacidad de 15 mL.
- Baño de agua termostático Digiterm100.
- Centrífuga Centronic-bl II.
- Jeringa de 20 mL Norm-Ject.
- Filtros de 0,2 μ m Agilent.

4.2.2.2. Procedimiento experimental

Las nanopartículas de plata se obtienen mezclando el extracto anteriormente separado y la disolución de nitrato de plata 0,01M en tubos de ensayo y agua Milli-Q, según se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3 Condiciones experimentales de preparación de las nanopartículas de plata.

Muestra	Tipo Extracto	Extracto (ml)	AgNO3 (ml)	Agua Milli-Q (ml)
1.0.	Extracto 1	8	0	6
1.1.	Extracto 1	8	1	5
1.2.	Extracto 1	8	3	3
1.3.	Extracto 1	8	6	0
2.0.	Extracto 2	8	0	6
2.1.	Extracto 2	8	1	5
2.2.	Extracto 2	8	3	3
2.3.	Extracto 2	8	6	0
3.0.	Extracto 3	8	0	6
3.1.	Extracto 3	8	1	5
3.2.	Extracto 3	8	3	3
3.3.	Extracto 3	8	6	0

Los tubos se sumergen en un baño de agua termostático a 80 °C durante 2 h, tal y como se puede observar en la **Figura 13**.



Figura 13 Baño de agua termostático.

Una vez enfriados, se centrifugan las muestras a 5000 r.p.m. durante 30 min, y se recoge el sobrenadante o se filtra mediante una jeringa con filtro de 0,2 μm . En el presente estudio, se ha centrifugado (método 1) y filtrado (método 2).

Finalmente, las muestras se mantienen en el frigorífico 4°C aproximadamente para posteriores análisis [60].

4.3. Determinación de polifenoles

4.3.1. Reactivos y material

Los reactivos utilizados son los siguientes:

- Ácido gálico 2000 mg/L de ACROS (pureza 97,5-102,5%)
- Folin-Ciocalteu de Scharlau.
- Carbonato sódico 10% en peso de Merck (grado ACS).

Las disoluciones se han preparado a partir de pesada directa del sólido.

El instrumental utilizado es el siguiente:

- Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Shimadzu.

4.3.2. Procedimiento experimental

En primer lugar, para la determinación de polifenoles se debe realizar una recta de calibrado con diferentes patrones. Dichos patrones se preparan a partir de 0,2 mL de diferentes concentraciones de ácido gálico (o agua Milli-Q en caso del blanco), 4 mL de agua Milli-Q y 1,2 mL de reactivo Folin-Ciocalteu. Pasados 2 minutos, se añaden 1,8 mL de carbonato Sódico (10 % en peso) y se enrasa con agua Milli-Q en un matraz de 10 mL. Las concentraciones de ácido gálico utilizadas han sido de 800, 1000, 1200, 1400 y 1800 mg/L (ver **Figura 14**) preparadas a partir del stock de 2000 mg/L, siendo el patrón 1 el de menor concentración, y el 5 el de mayor.

Una vez pasadas 2 h, las disoluciones son analizadas en el espectrofotómetro Ultravioleta-Visible a una longitud de onda fija comprendida entre 760-780 nm. Concretamente, en el método 1 (centrifugado) se utilizó 779 nm y en la segundo (filtrado) 770 nm.



Figura 14 Patrones para la recta de calibrado.

En segundo lugar, se sigue el mismo procedimiento para preparar las disoluciones con el extracto, **Figura 15**, teniendo en cuenta que se debe añadir 0,2 mL de extracto en lugar de estándar [60] [58].



Figura 15 Muestras preparadas para analizar los polifenoles.

4.4. Determinación de azúcares reductores

4.4.1. Reactivos y material

Los reactivos utilizados son los siguientes:

- Ácido sulfúrico (98%) 1,6 M de PanReac (grado ACS).
- Hidróxido de sodio 5 M de Scharlau (grado NF).
- Sulfato de cobre II anhidro 0,167 M de PanReac (grado BP).
- Tartrato de sodio y potasio 0,886 M de PanReac (grado ACS).
- Yoduro de potasio (30%) 1,807 M de PanReac (grado USP).
- Tiosulfato de sodio pentahidratado 0,1102 M de PanReac (grado USP).
- Almidón al 1% de Sigma-Aldrich (grado ACS).

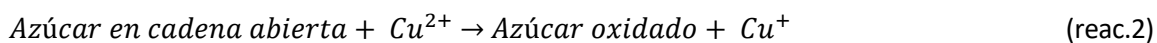
Todas las disoluciones se han preparado a partir de pesada directa del sólido. El material e instrumentación utilizado es el siguiente:

- Baño de agua termostático Digiterm100.
- Matraz Erlenmeyer de 200 mL.
- Bureta 25 mL.

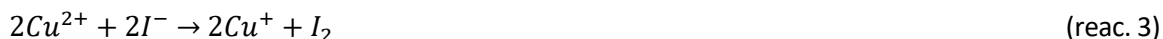
4.4.2. Procedimiento experimental

La concentración de azúcares reductores se determina por el método de Rebelein, el cual es una valoración por retroceso donde se usa el poder reductor de la glucosa y la fructosa sobre el reactivo de Fehling [63]. Dicho reactivo es una mezcla de sulfato de cobre pentahidratado y tartrato de potasio y sodio en base fuerte.

En la primera etapa del método, el cobre que contiene el reactivo es reducido por los azúcares reductores.



En la siguiente, se añade yoduro en solución básica a la mezcla para reducir al ion de cobre (II).



A continuación, la disolución es neutralizada con ácido sulfúrico y se añade un indicador (almidón) a la muestra. Éste se une al yodo y da a la muestra un aspecto azul-grisáceo. Cuando la muestra se valora con una solución de tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), los iones tiosulfato reducen el yodo y vuelve a pasar a yoduro:



En el punto final de la valoración, la disolución pasa a un color blanco cremoso [64]. En la ecuación (1) se encuentra el cálculo de la concentración de azúcares reductores.

$$\text{Azúcares reductores} \left(\frac{\text{g}}{\text{l}} \right) = \text{Volumen valoración blanco} - \text{Volumen valoración muestra} \quad (1)$$

Concretamente, el procedimiento seguido en el laboratorio es el siguiente. En primer lugar, se debe preparar las muestras y el blanco para ser analizados. Para ello, se añade en un matraz Erlenmeyer de 200 mL, 10 mL de disolución de sulfato de cobre, 5 mL de tartrato de sodio y potasio y 2 mL de extracto, o, en caso del blanco, agua Milli-Q.

A continuación, se coloca el matraz Erlenmeyer en un baño de agua termostático a 94 °C durante 5 min. y, seguidamente, se enfría con agua corriente. Una vez frío, se agrega, en el orden indicado, 10 mL de yoduro de potasio, 10 mL de ácido sulfúrico (16%) y 10 mL de almidón como indicador.

Finalmente, se realiza una valoración con tiosulfato de sodio. Como se observa en la **Figura 16**, la disolución cambia de color de marrón a blanco-grisáceo [64].



Figura 16 Valoración de azúcares reductores. izquierda) muestra inicial derecha) muestra final.

4.5. Resultados y discusión de la síntesis de nanopartículas de plata y análisis de extractos

4.5.1. Determinación de nanopartículas por Espectrometría UV-Visible

4.5.1.1. Fundamento teórico

La espectroscopia es el estudio de la interacción entre la materia, es decir, las moléculas, los átomos, los núcleos y la radiación electromagnética. Los tipos de espectroscopia dependen, por lo tanto, de la interacción que la materia tiene con la radiación. El tipo más común de espectroscopia es la de absorción [65]. En ella se compara la intensidad de un haz de luz medida antes y después de la interacción con la muestra. Dentro de este tipo de espectroscopia se encuentra la de ultravioleta-visible, en la que se mide cuánta luz de una longitud de onda particular es absorbida por la muestra [66].

La espectrometría UV-Vis implica la espectroscopia de fotones en la región visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR). En esta región del espectro electromagnético, **Figura 17**, las moléculas se someten a transiciones electrónicas [67].

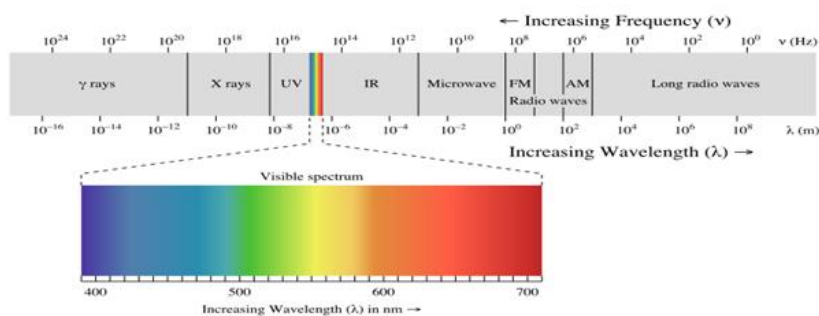


Figura 17 Espectro electromagnético [68].

El instrumento que se utiliza en esta técnica es el espectrofotómetro. Sus partes básicas son las siguientes:

- Cubetas de espectrofotometría, las cuales pueden ser de cuarzo, para trabajar con luz ultravioleta, o de plástico, para emplear luz visible.
- Fuente de luz. Las lámparas empleadas pueden ser de wolframio, de arco de xenón y de deuterio.
- Monocromador para separar las diferentes longitudes de onda de la luz.
- Detector [69].

Esta técnica es muy útil para la determinación nanopartículas de plata. Existen gran número de artículos en los que se ha investigado este tipo de nanopartículas metálicas, pudiendo saber así, que la absorbancia máxima si hay presencia de los coloides se encuentra alrededor de las longitudes de onda de 400 a 450 nm [70].

Preparación de las muestras

Para realizar el análisis de las muestras, éstas se deben poner en la cubeta de espectrofotometría, en este caso de plástico, puesto que la longitud de onda en la que se trabaja es mayor de 380 nm.

Para la preparación, se debe tener en cuenta que la absorbancia no sea mayor que dos. En la **Tabla 4** se muestran los factores de dilución utilizados para cumplir dicho requisito.

Tabla 4 Factor de dilución. izquierda) método 1 derecha) método 2.

Muestra	Factor de dilución	Muestra	Factor de dilución
1.1.	1:2	1.1.	1:4
1.2.	1:2	1.2.	1:8
1.3.	1:8	1.3.	1:21,3 ^(*)
2.1.	1:2	2.1.	1:4
2.2.	1:2	2.2.	1:8
2.3.	1:4	2.3.	1:21,3 ^(*)
3.1.	1:2	3.1.	1:4
3.2.	1:2	3.2.	1:16
3.3.	1:4	3.3.	1:21,3 ^(*)

(*) Diluido primero 0,5:4 y posteriormente 1,5:4

4.5.1.2. Resultados y discusión de la síntesis húmeda

El cambio de color de las semillas y el resto de las muestras, el cual se ve en la **Figura 18**, indican la formación de nanopartículas sintéticas.

**Figura 18** Nanopartículas sintéticas.

Asimismo, los espectros obtenidos (**Figura 19**) también demuestran la existencia de coloides. Entre 400 y 450 nm aparecen las bandas de absorción pertenecientes a la presencia de nanopartículas metálicas esféricas ya que son debidas a la absorción por resonancia de los plasmones superficiales.

Por otro lado, los nanoprismas de plata tienen una longitud de onda cercana a 600 nm. Como se observa, la posición en el espectro puede ser variada y ajustada según el tamaño de éstos. Sus dimensiones pueden ser controladas mediante una variación de la cantidad de semillas agregada en su crecimiento. Se corrobora así que cuantas más semillas se agregan, menor es el tamaño de los

nanoprismas y por lo tanto, el plasmón espectral se acerca más al espectro de las semillas precursoras [12] [71].

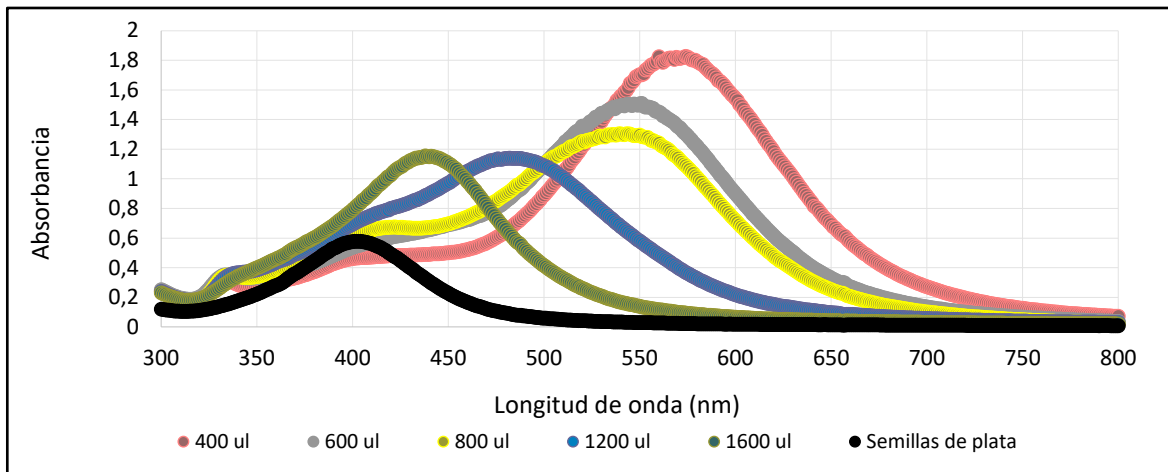


Figura 19 Espectro UV-vis nanopartículas sintéticas.

4.5.1.3. Resultados y discusión de la síntesis verde

El primer indicador de la existencia de nanopartículas de plata es el cambio de color que experimentan las muestras (**Figura 20 y 21**), el cual es debido al fenómeno de resonancia de plasmones superficiales [72]. El plasmón se produce por el fenómeno vibratorio típico de los plasmas, creado por la interacción de la radiación electromagnética de baja frecuencia y los portadores de carga libres, oscilando en resonancia con ésta [73].

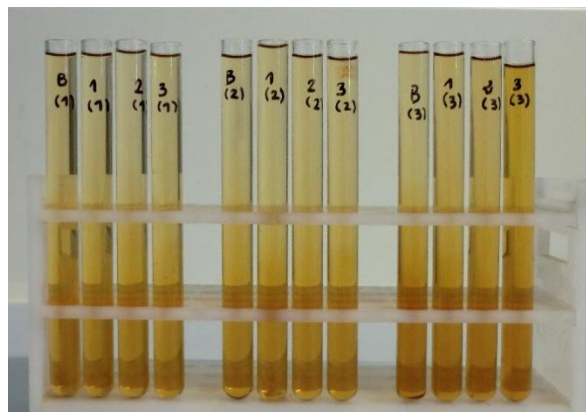


Figura 20 Nanopartículas en tiempo inicial.

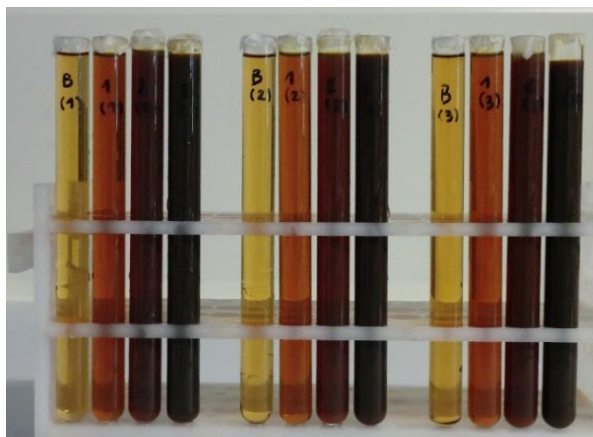


Figura 21 Nanopartículas en tiempo final.

Las **figuras 22-27** muestran los espectros correspondientes a las nanopartículas de plata obtenidas mediante la síntesis verde en función de los distintos extractos y método utilizado (método 1: centrifugado o método 2: filtrado), siguiendo la nomenclatura de la **Tabla 2**.

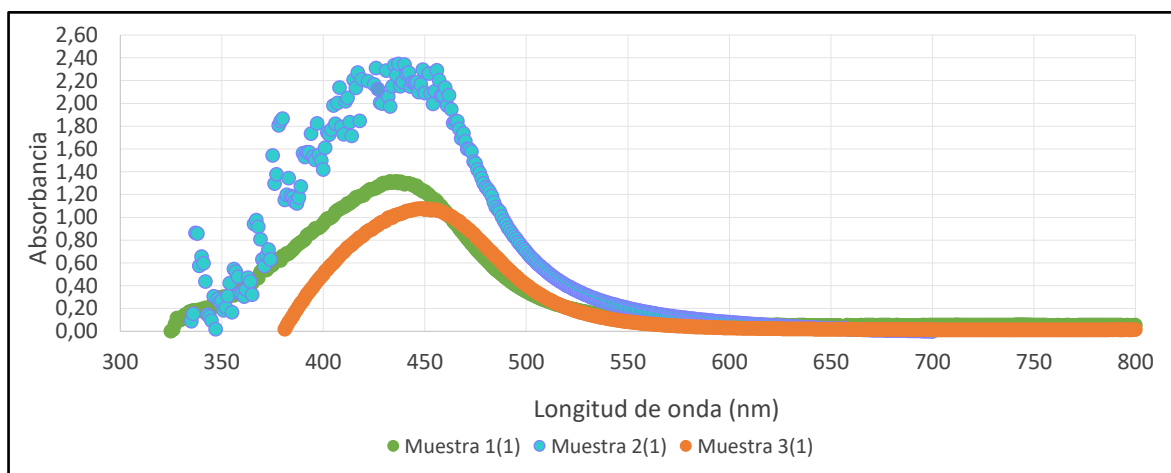


Figura 22 Espectros UV-vis de las nanopartículas de Ag usando el extracto 1 (método 1).

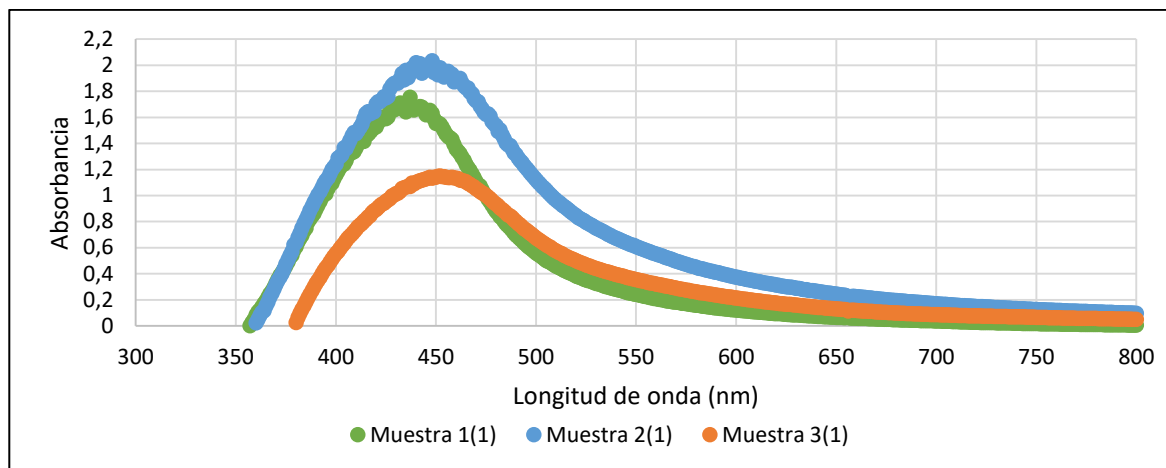


Figura 23 Espectros UV-vis de las nanopartículas de Ag usando el extracto 1 (método 2).

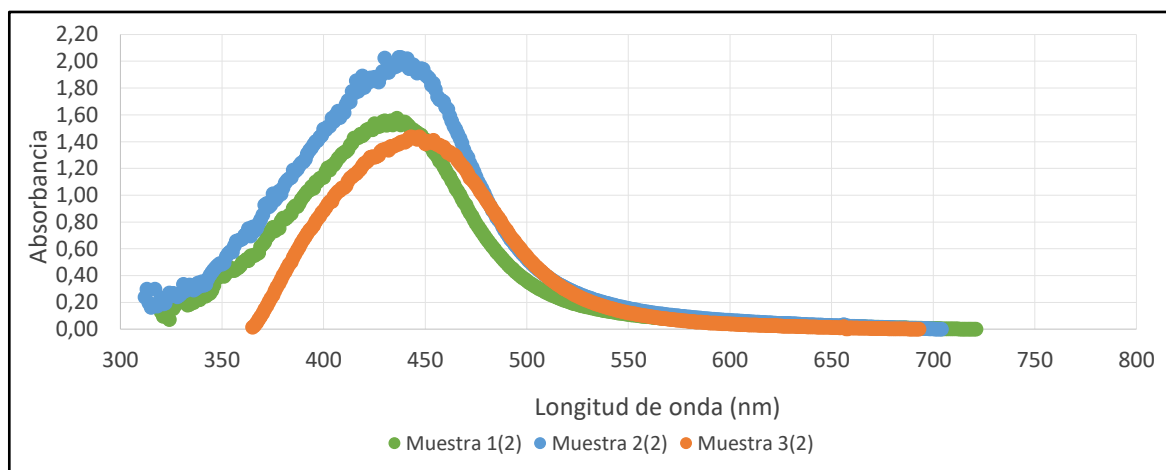


Figura 24 Espectros UV-vis de las nanopartículas de Ag usando el extracto 2 (método 1).

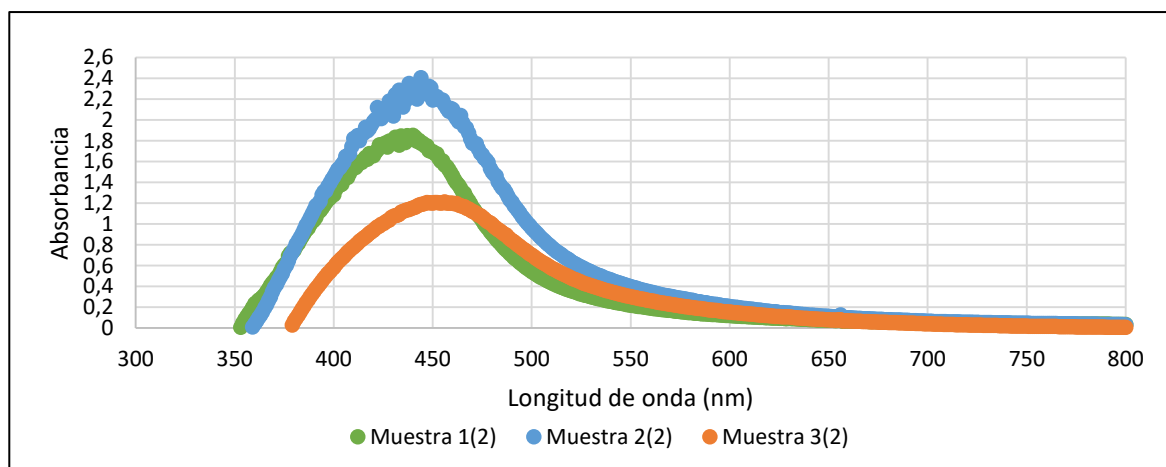


Figura 25 Espectros UV-vis de las nanopartículas de Ag usando el extracto 2 (método 2).

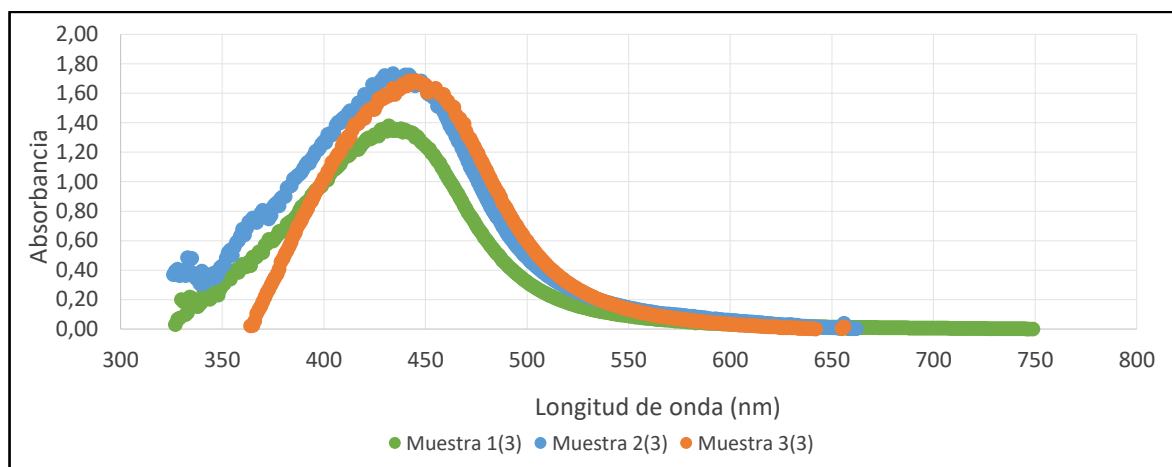


Figura 26 Espectros UV-vis de las nanopartículas de Ag usando el extracto 3 (método 1).

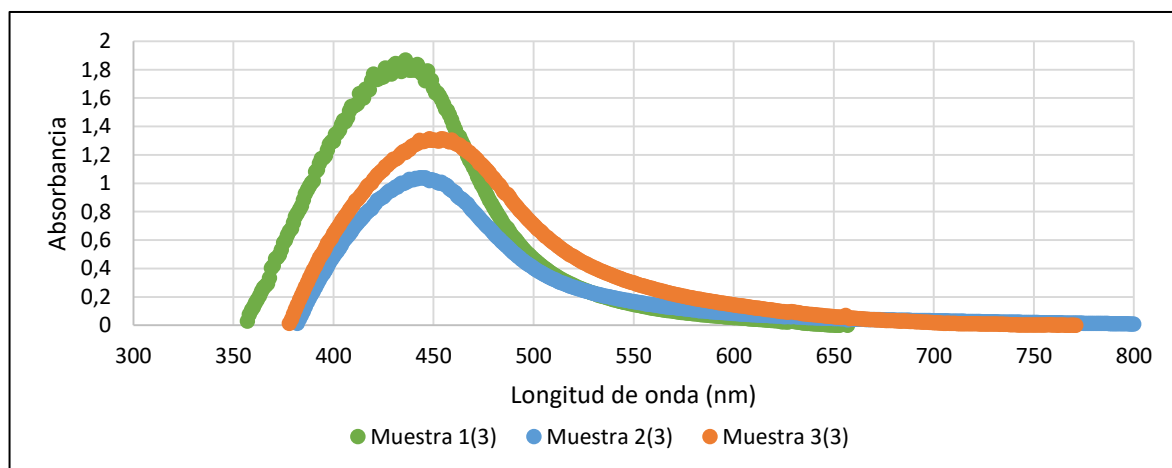


Figura 27 Espectros UV-vis de las nanopartículas de Ag usando el extracto 3 (método 2).

La absorbancia máxima en todas las figuras se encuentra dentro del rango de aproximadamente, 400-450 nm por lo tanto, se verifica la existencia de coloides. Teniendo en cuenta el factor de dilución aplicado y la absorbancia máxima de cada muestra, se observa que utilizando el segundo método (filtración) se consiguen más nanopartículas que con el primero. También, en todas ellas coincide que el área bajo la curva del espectro es mayor cuanto más cantidad de nitrato de plata se ha añadido al extracto, es decir, mayor número de nanopartículas se han formado. Esto se puede comprobar en la **Figura 28**, en la cual aparece una representación de la concentración proporcional de nanopartículas según el tipo de extracto y método. Es decir, para cada extracto se ha tomado como base la concentración de las muestras con menor cantidad de nitrato de plata (1 mL), y se ha comparado con la de 3 y 6 mL.

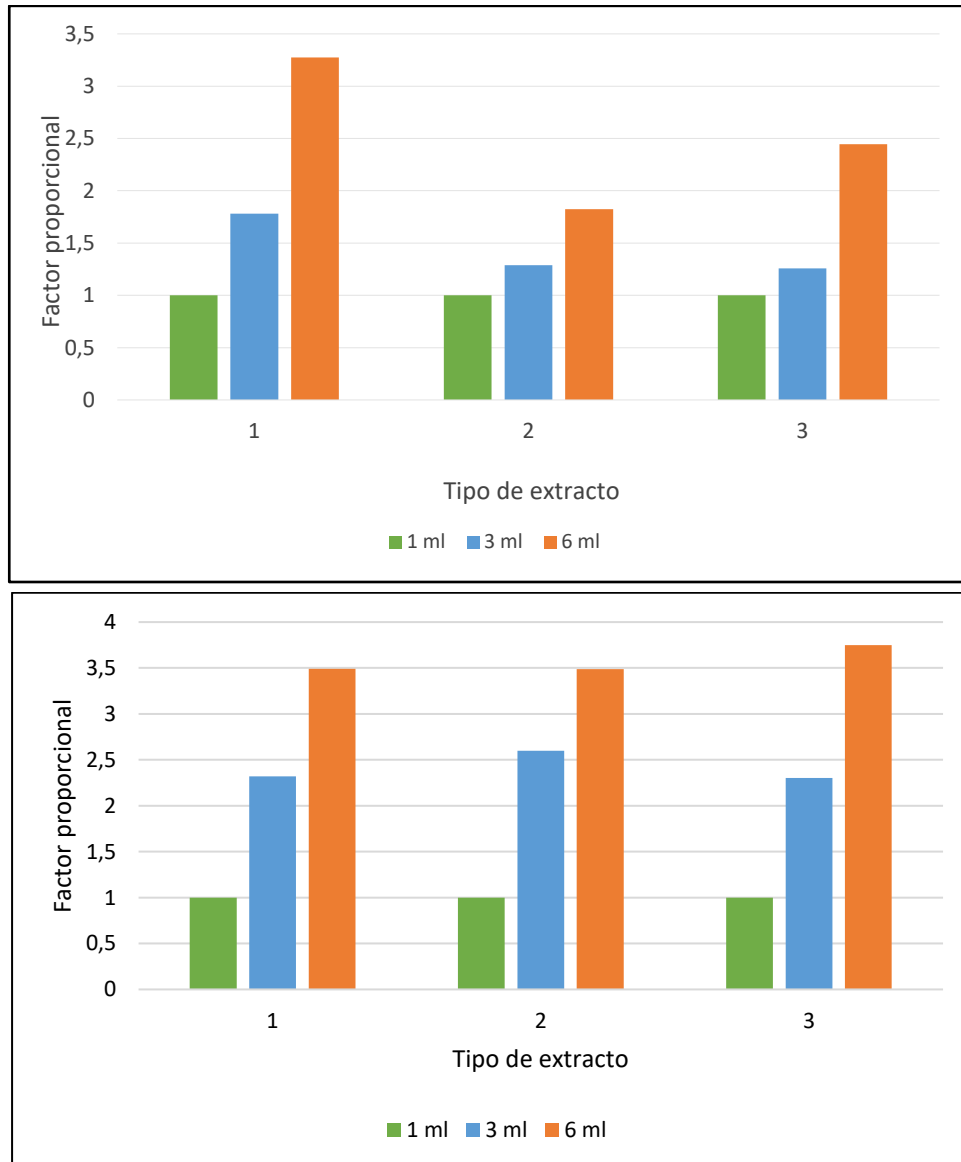


Figura 28 Comparación de cantidad de nanopartículas al variar el extracto y concentración de plata en la síntesis . arriba) método 1 abajo) método 2.

Por otro lado, como se ve en la **Tabla 5**, algo que destaca en todas las figuras es el desplazamiento del máximo del espectro hacia longitudes de onda más grandes cuanto mayor es la cantidad de plata adicionada. Este hecho significa que cuanto más a la derecha del espectro está el máximo, superior es el tamaño de la nanopartícula [71]. Dicha coyuntura se comprobará con las diferentes técnicas de caracterización de las partículas.

Tabla 5 Longitud de onda de máxima absorbancia obtenida para las diferentes muestras (izquierda) método 1 (derecha) método 2.

Muestra	λ de máxima absorbancia (nm)	Muestra	λ de máxima absorbancia (nm)
1(1)	436	1(1)	437
2(1)	437	2(1)	448
3(1)	449	3(1)	452
1(2)	436	1(2)	440
2(2)	437	2(2)	444
3(2)	447	3(2)	456
1(3)	432	1(3)	436
2(3)	434	2(3)	444
3(3)	445	3(3)	454

4.5.2. Determinación de Polifenoles en extracto de raspo de uva

Primeramente, se han realizado dos rectas de calibrado, una para cada método ya que las muestras se analizaron en distintos días. Para ello, los patrones se han diluido 1:5 con agua Milli-Q puesto que tenían una absorbancia mayor que 2. Las **Tablas 6 y 7** muestran los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones de los patrones. La segunda columna corresponde a la concentración de ácido gálico existente en cada matraz de 10 mililitros, la tercera la concentración de cada matraz una vez diluido 1:5 (ver ecuación (2)) y la cuarta corresponde a la absorbancia de los patrones una vez diluidos.

$$\text{Concentración diluido} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \text{Concentración} \cdot \frac{1}{5} \quad (2)$$

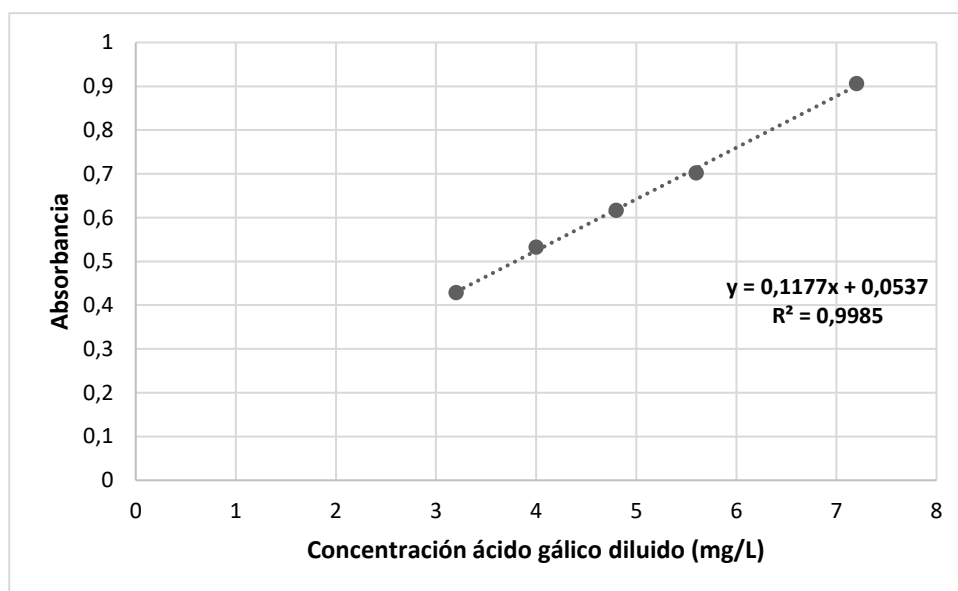
Tabla 6 Absorbancia en función de la concentración de ácido gálico (Método 1).

Patrón	Concentración (mg/L)	Concentración diluido (mg/L)	Absorbancia
1	16	3,2	0,42852
2	20	4,0	0,53262
3	24	4,8	0,61705
4	28	5,6	0,70240
5	36	7,2	0,90590

Tabla 7 Absorbancia en función de la concentración de ácido gálico (Método 2).

Patrón	Concentración (mg/L)	Concentración diluido (mg/L)	Absorbancia
1	16	3,2	0,41634
2	20	4,0	0,50298
3	24	4,8	0,60332
4	28	5,6	0,70666
5	36	7,2	0,90328

Las rectas de calibrado, con un muy buen ajuste, como se puede observar en las ecuaciones de la regresión lineal obtenidas, se pueden observar en las **figuras 29 y 30**.

**Figura 29** Recta de calibrado (método 1).

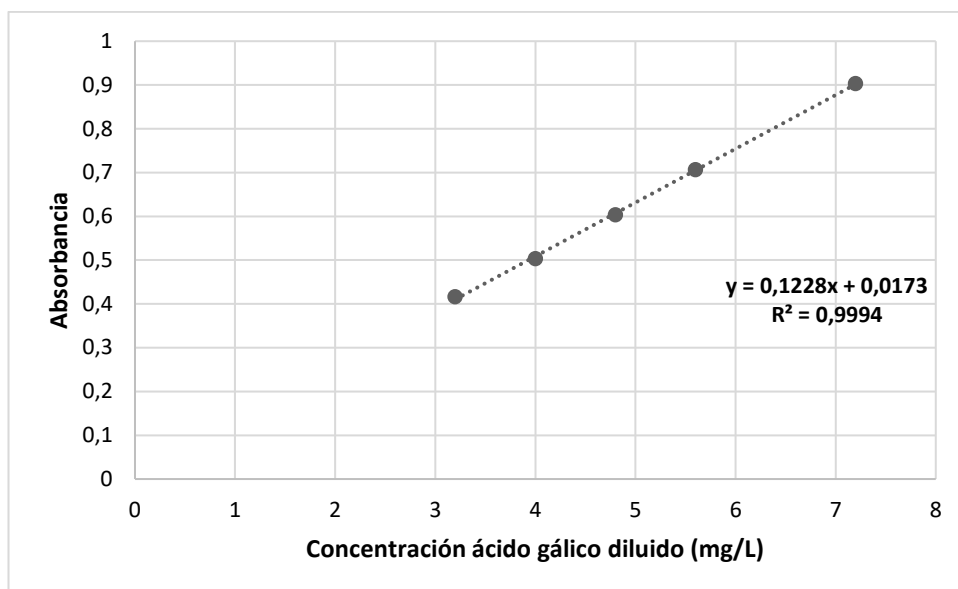


Figura 30 Recta de calibrado (método 2).

Las muestras de los extractos preparados anteriormente, se han diluido 1:2 para medir su absorbancia puesto que ésta debe tener un valor situado dentro del rango de linealidad de la recta de calibrado. En las **Tablas 8 y 9** se encuentran dichos valores y los de concentración de polifenoles, calculados a partir de las rectas de calibrado anteriores y la ecuación (3).

$$\text{Concentración de las muestras} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \text{Concentración diluido} \cdot \frac{10}{0,2} \cdot 2 \quad (3)$$

Tabla 8 Concentración de polifenoles (método 1).

Extracto	Absorbancia	Concentración diluido (mg/L)	Concentración polifenoles (mg/L)
1	0,66955	5,2	523,2
2	0,68649	5,4	537,6
3	0,75342	6,0	594,5

Tabla 9 Concentración de polifenoles (método 2).

Extracto	Absorbancia	Concentración diluido (mg/L)	Concentración polifenoles (mg/L)
1	0,48331	3,8	379,5
2	0,58028	4,6	458,5
3	0,62137	4,9	491,9

En primer lugar, como era de esperar, a mayor tiempo de contacto se ha observado mayor cantidad de polifenoles en el extracto. Sin embargo, los dos métodos coinciden en que la concentración de polifenoles obtenida por los tres tipos de extracto no es muy diferente. Las **Figura 31** y **Figura 32** muestran la tendencia que sigue la concentración de polifenoles en función del tiempo de contacto para los dos métodos de filtración.

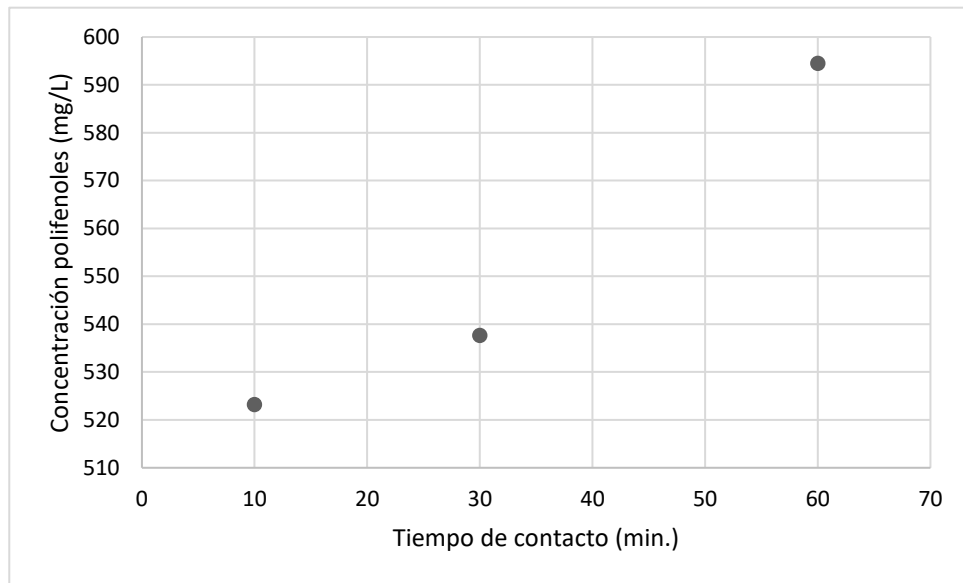


Figura 31 Concentración vs. Tiempo de contacto (método 1).

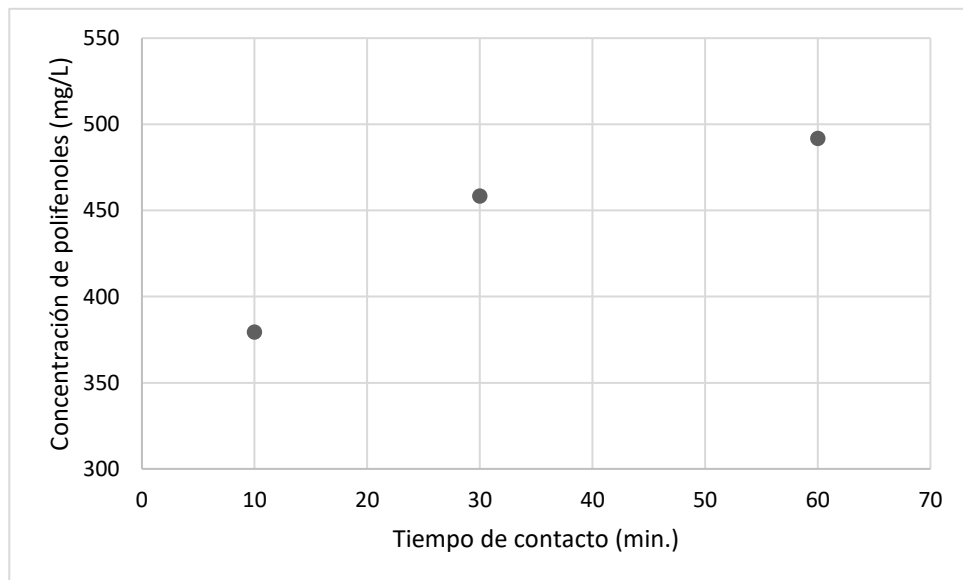


Figura 32 Concentración vs. Tiempo de contacto (método 2).

En segundo lugar, se puede ver que los valores de polifenoles en ambas réplicas son bastante diferentes. Esto puede deberse a que utilizando los filtros de 0,2 μm (método 2) se pierde mucho más

extracto que con la centrifuga (método 1) ya que se queda parte del líquido en los filtros, provocando así, una lógica disminución de los polifenoles.

Por lo tanto, se puede concluir que el mejor método para eliminar los posibles sedimentos de las muestras es la centrifugación en lugar de la filtración, teniendo en cuenta que previamente se ha filtrado con un embudo Büchner en ambos métodos.

En la **Tabla 10** se muestra los valores de los errores relativos y absolutos (ver ecuación 4 y 5) de la determinación de polifenoles de cada extracto en función del método de separación.

$$\text{Error absoluto} = \text{Valor real} - \text{Media aritmética} \quad (4)$$

$$\text{Error relativo} = \frac{\text{Error absoluto}}{\text{Media aritmética}} \cdot 100 \quad (5)$$

Tabla 10. Errores absolutos y relativos de las medidas de polifenoles en cada extracto y método.

	Método 1	Método 2
Media aritmética concentración polifenoles (mg/L)	551,8	443,3
Error absoluto extracto 1 (mg/L)	-28,5	-63,8
Error absoluto extracto 2 (mg/L)	-14,2	15,2
Error absoluto extracto 3 (mg/L)	42,7	48,6
Error relativo extracto 1 (%)	-5,2	-14,4
Error relativo extracto 2 (%)	-2,6	3,4
Error relativo extracto 3 (%)	7,7	11,0

Se puede comprobar que, a pesar de lograr más concentración de polifenoles con el máximo tiempo de contacto, esta disparidad no es muy elevada, por consiguiente, se puede preparar el extracto utilizando el mínimo tiempo, haciendo así el método más verde.

4.5.3. Determinación de azúcares reductores en extracto de raspo de uva

Observando los resultados del estudio de polifenoles, se ha realizado el análisis de azúcares reductores sólo del extracto del método 1, es decir, el que usa centrifugación.

La valoración del blanco consumió 16,0 mL de tiosulfato de sodio. La **Tabla 11** muestra los valores de tiosulfato gastados por las muestras y el valor de azúcares reductores.

Tabla 11 Volumen de tiosulfato de sodio consumido en la valoración (V_b es la cantidad de tiosulfato consumida por el blanco y V_c por el extracto)

Extracto	Volumen tiosulfato consumido (mL)	$V_b - V_c$ (mL)	Cantidad azúcares reductores (g/L)
1	15,6	0,4	0,4
2	15,5	0,5	0,5
3	15,1	0,9	0,9

Como se observa, y era de esperar, el extracto con más tiempo de reflujo es el que más cantidad de azúcares reductores contiene. Sin embargo esta diferencia no es muy grande por lo tanto, se puede concluir que un tiempo de reflujo de 10 minutos es ya suficiente para la preparación del extracto de raspo de uva.

5. Caracterización de las nanopartículas

Mediante diferentes técnicas de caracterización (e.j. microscopia de fuerzas atómicas, microscopía interferométrica, microscopia electrónica de barrido, etc), se permite evaluar el tamaño, la forma y la distribución de las nanopartículas de plata en el interior del extracto de raspo de uva, tal y como se mostrará a lo largo de esta sección.

5.1. Análisis de rugosidad

La rugosidad es un concepto usado en topografía para describir las irregularidades existentes a nivel superficial. El grado de ésta es muy importante tanto en aplicaciones industriales, en la vida cotidiana o incluso como factor biológico; en particular en este trabajo final de grano el análisis de la rugosidad nos permitirá de manera cualitativa conocer el proceso de secado de la disolución heterogénea de raspo de uva con nanopartículas de plata.

Para evaluar la rugosidad existen diferentes equipos, accesorios y métodos. Principalmente, se pueden clasificar en técnicas de contacto y no-contacto. Los equipos de contacto, como ejemplo el perfilómetro o el microscopio de fuerza atómica (MFA) aunque éste último también puede operar en modo no-contacto; permiten determinar la topografía así como los parámetros de rugosidad obtenidos a partir de la acción mecánica de una punta sobre la superficie de estudio. Por otra parte, los equipos ópticos o interferométricos son técnicas de no-contacto, que permiten evaluar la rugosidad por medio de la interacción de la luz sobre la superficie de interés [74].

A partir de las imágenes obtenidas tanto por métodos de contacto como no-contacto, permiten caracterizar la rugosidad de la superficie de interés. Principalmente, existen dos parámetros que permiten caracterizar la rugosidad (ver **Figura 33**):

- ***Ra* (Roughness average)**: desviación media aritmética de todos los puntos del perfil de rugosidad desde una línea media sobre la longitud de evaluación. La ecuación de este parámetro se encuentra a continuación, donde N es el número total de muestras y r_j la distancia desde la altura media.

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |r_j| \quad (6)$$

- ***Rq* (Root Mean Square Roughness)**: media cuadrático de las desviaciones de altura tomadas dentro de los límites de la longitud de evaluación y medidas des de una línea media. En las

normas americanas, este valor se indica en micropulgadas y se conoce como Root Mean Square (RMS) [75].

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N r_j^2} \quad (7)$$

En la **Figura 33** se encuentran representados los parámetros más importantes que nos permiten analizar la rugosidad de los materiales.

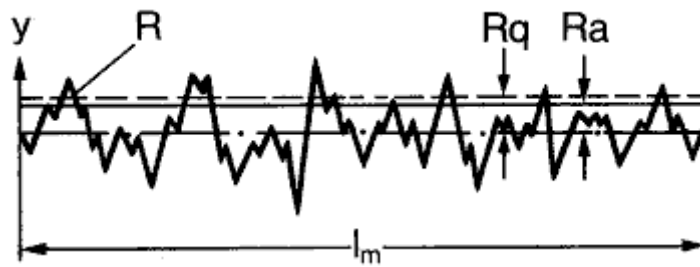


Figura 33 Parámetros de rugosidad Ra y Rq [76].

5.2. Técnicas de caracterización

5.2.1. Microscopía de fuerza atómica (Atomic Force Microscopy, AFM)

El microscopio de fuerza atómica o en inglés atomic force microscopy (AFM) pertenece a la familia de instrumentos capaces de proporcionar imágenes directas de la disposición de los átomos individuales. Éste utiliza una pequeña fuerza para trazar una imagen de la estructura de la superficie de un material [77].

La técnica presenta las siguientes ventajas (verde) y desventajas (rojo), las cuales se encuentran a continuación:

- Es una buena herramienta para analizar muestras muy pequeñas con un gran grado de precisión.
- A diferencia de las tecnologías rivales, no requiere aplicar vacío ni someter a la muestra a un tratamiento que podría dañarla.
- El tamaño de imagen de escaneo, el cual es del orden de micrómetros, en comparación con milímetros para un microscopio electrónico de barrido.
- El tiempo de exploración relativamente lento, que puede conducir a la deriva térmica sobre la muestra [78].

La **Figura 34** muestra un esquema básico de los principales accesorios que constituyen el AFM.

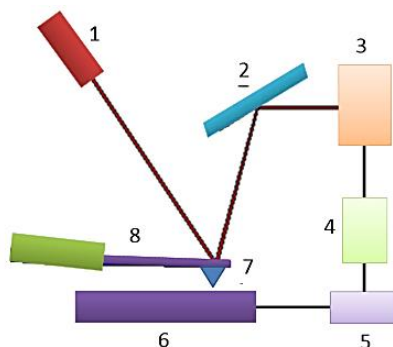


Figura 34 Esquema de AFM [79], donde 1 láser, 2 espejo, 3 fotodetector, 4 amplificador, 5 registro, 6 muestra, 7 punta (sonda de barrido) y 8 cantilever.

En el AFM, el mapa de topografía o de altura se crea gracias a la interacción de la superficie con una punta muy aguda de menos de 100 Å de diámetro (ver **Figura 35**), la cual es localizada al final del brazo del cantilever de 100 a 200 µm de largo. Conforme la punta barre la superficie, un fotodetector mide la flexión del cantilever producida por la fuerza entre ambas, generando así la imagen topográfica. Este tipo de medida puede ser aplicada tanto a materiales aislantes, semiconductores o conductores [80].

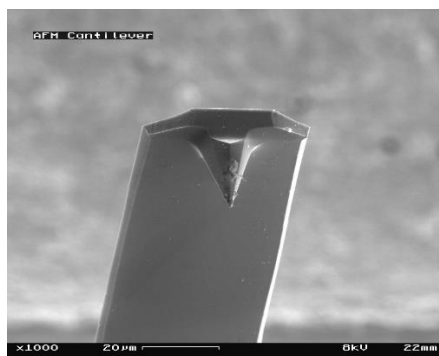


Figura 35 Punta AFM [81].

El AFM tiene principalmente tres diferentes modos de operación:

- **Modo de contacto:** la sonda experimenta predominantemente fuerzas repulsivas de Van der Waals. La punta toca de manera continua, la superficie y la separación entre la sonda y la superficie es inferior a 0,5 nm.
- **Modo de “tapping”:** la punta oscila a una frecuencia determinada (frecuencia de resonancia de la punta), con una separación de la superficie de la sonda de alrededor de 0,5 - 2 nm.
- **Modo no- contacto:** la separación entre la sonda y la superficie es de alrededor de 0,1 a 10 nm [82].

La técnica tiene una resolución superior a la de un perfilómetro, con una resolución vertical (eje z) de hasta 1 nm y horizontal (ejes x e y) de 5 nm [75].

Como se ha dicho anteriormente, las principales aplicaciones del microscopio se encuentran en el estudio de superficies en materiales biológicos y en el análisis estructural superficial de polímeros termoplásticos de almidón, así como la caracterización de la morfología de segundas fases. En este trabajo final de grado, se ha utilizado el Dimension D3100 (Veeco), ver **Figura 36**, en modo contacto para evaluar la morfología de las diferentes muestras; dos escaneos con diferentes dimensiones ($1 \times 1 \mu\text{m}$ y $5 \times 5 \mu\text{m}$, han sido realizado por cada muestra). Posteriormente, las imágenes han sido tratadas mediante el software WSxM [83].



Figura 36 AFM Dimension D3100 (Veeco) [84].

Preparación de la muestra

En primer lugar, se ha mezclado 1 ml de muestra y 3 ml de etanol en un ependorf. Sobre una placa de silicio de la marca Ted Pella se ha depositado una gota de la mezcla tal y como se muestra en la **Figura 37** y se ha dejado secar en una estufa a 50°C durante unos 30 min.



Figura 37 Preparación de la muestra para ser observada por AFM.

5.2.2. Microscopía interferométrica

La interferometría es una técnica de no contacto que proporciona una caracterización superficial de la muestra de interés. Es una técnica no destructiva que permite caracterizar los principales parámetros de rugosidad, tales como: perfiles de altura, rugosidad, etc [85].

El principio básico de la técnica de interferometría óptica (ver **Figura 38**), es relativamente simple. El interferómetro se posiciona justo por debajo o por encima del objetivo de un sistema óptico, el cual provoca que el haz que emerge de la fuente de luz visible se divida en dos; uno de ellos se dirige hacia a la superficie de la muestra a estudiar y el otro a una superficie de referencia perfectamente lisa. Una vez se vuelven a recombinar dentro del interferómetro los dos haces reflejados, se produce el fenómeno de interferencia constructiva y destructiva, generando un patrón de franjas brillantes y oscuras. Esto es debido a que la intensidad de luz de cada punto depende de la diferencia de trayectoria entre los dos haces, y en este caso, la distancia que recorren la luz incidente y la reflejada desde el divisor no es la misma.

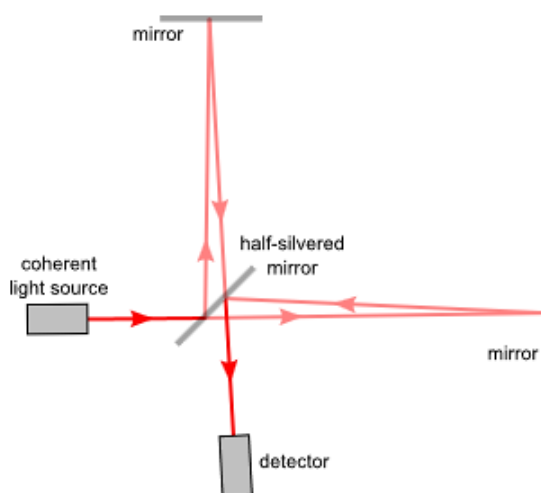


Figura 38 Principio básico de funcionamiento de la interferometría [86].

Finalmente, el patrón es registrado digitalmente por un conjunto de fotodiodos conectados a un microprocesador. La interferencia entre las ondas de luz se analiza para obtener una imagen topográfica tridimensional de la superficie de la muestra que se quiere caracterizar [85]. En este trabajo final de grado, se ha utilizado un interferómetro óptico de láser Wyko 9300 NT (Veeco). Las imágenes han sido tratadas mediante el software Vision 5.0.

Preparación de la muestra

Las muestras empleadas han sido las mismas que las que han sido descritas en el **apartado 1.2.1**.

5.2.3. Microscopía electrónica

Cuando un haz de electrones se dirige hacia una muestra sólida puede provocar que los electrones no se desvíen o que la atraviesen, siendo así dispersados, absorbidos, reflejados y transmitidos. Únicamente cuando el material es suficientemente delgado se transmite una fracción significativa del haz.

La **Figura 39** muestra una representación esquemática de las diferentes interacciones de un haz de electrones con una muestra, las cuales se clasifican según sean de interés en microscopía electrónica de transmisión (*transmission emission microscopy*, TEM), de barrido de alta resolución (*field emission scanning electron microscopy*, FESEM) y microanálisis de rayos X (*energy dispersive X-ray spectroscopy*, EDX o EDS).

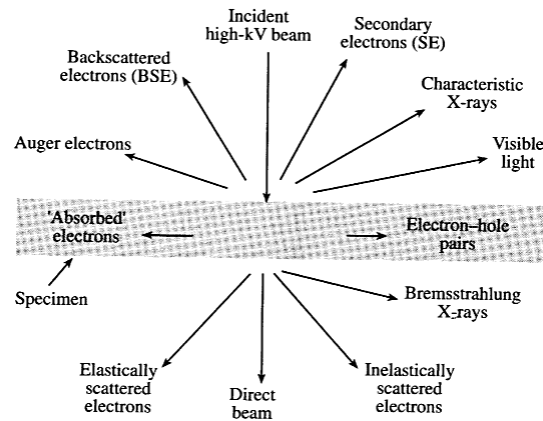


Figura 39 Interacción del haz de electrones con la muestra [87].

Una vez el haz interactúa con la muestra, ésta puede emitir diferentes tipos de electrones, tal y como se muestra en la **Figura 40**.

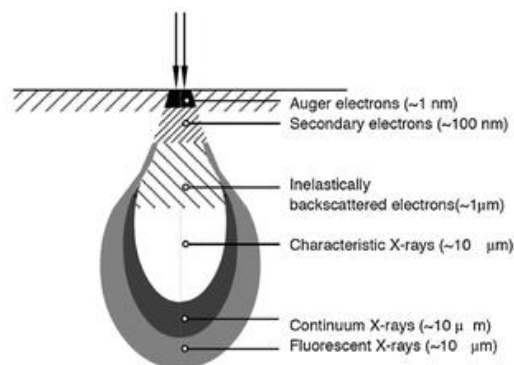


Figura 40 Emisiones de la muestra en SEM [88].

El estudio de cada una de estas emisiones permite extraer un tipo de información determinada del material. La observación de los electrones secundarios nos permite obtener información topográfica, mientras que la observación de los electrones retrodispersados permite obtener una información cualitativa sobre la composición elemental promedio de la zona observada. También, se puede realizar el análisis de elementos por dispersión de energía (*Energy Dispersive Spectroscopy*, EDS o *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*, EDX) aprovechando la radiación de rayos X de la muestra [92].

5.2.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La técnica de microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) es una de las más avanzadas para observar materiales a escala nanométrica. Con ella se puede analizar la superficie de materiales con una resolución más alta que en el caso del microscopio óptico convencional [89].

La **Figura 41** muestra una representación esquemática de los principales componentes del microscopio electrónico de barrido.

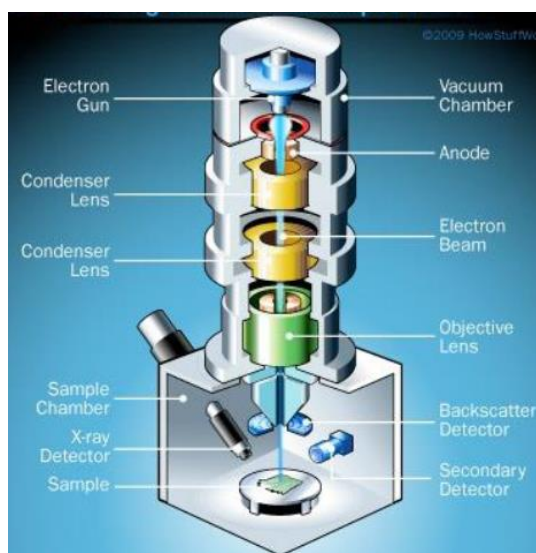


Figura 41 Principales componentes del SEM [90].

En primer lugar, el calentamiento de un filamento de wolframio combinado, a veces, con hexaboruro de lantano, es el responsable de genera el haz de electrones [90]. El haz es acelerado mediante un campo eléctrico hasta que finalmente penetra en la muestra y se obtienen las imágenes. Este proceso tiene lugar en una columna del microscopio mediante una diferencia de potencial de 1 a 30 kV [89]. La muestra está situada sobre una cámara de vacío equipada con varios detectores que permiten analizar diferentes tipos de electrones emitidos [90], tal y como se ha mostrado en la sección anterior (ver **Figuras 39 y 40**).

5.2.3.2. Microscopía electrónica de barrido de alta resolución

El microscopio de barrido de alta resolución (field emission electron microscopy, FESEM) es una herramienta muy útil para obtener imágenes de superficies en campos de la ciencia de los materiales. Su calidad de imagen es incluso superior a la del SEM ya que el haz de electrones producido es aproximadamente 1000 veces menor [90].

FESEM funciona de la misma manera que el microscopio electrónico de barrido, excepto que el haz de electrones es generado a baja temperatura. En éste, un filamento de tungsteno con un diámetro de punta de 10 a 100 nm, funciona como cátodo. Entre el cátodo y el ánodo existe, un voltaje de aceleración del orden de magnitud de 0,5 a 30 kV el cual acelera los electrones emitidos por el filamento de tungsteno hacia la muestra a estudiar. También, cabe mencionar que con el objetivo de disminuir las posibles interacciones entre los electrones y las partículas del aire, el equipo trabaja en vacío, de aproximadamente 10^{-6} Pa.

En el presente proyecto se ha utilizado la técnica de haz de iones focalizados (*field ion beam*, FIB) acoplada a un microscopio electrónico de barrido de alta resolución (FESEM). Además, el FIB/FESEM dispone de un detector de electrones transmitidos (*scanning transmission electrons microscope*, STEM) y de energía dispersiva (EDX) el cual permite determinar la forma y geometría de las nanopartículas de plata así como su composición química, respectivamente. En este trabajo final de grado se ha utilizado un FIB/FESEM Neon40 (Zeiss).

Preparación de la muestra

Una vez observadas las muestras por AFM y microscopía interferométrica; éstas han sido recubiertas por una capa de carbono con el principal objetivo de hacerlas conductoras y permitir así, la descarga de los electrones incidentes [85]. El recubrimiento se realiza en una cámara de vacío donde la muestra gira mientras las partículas de carbono están dispersas por el interior de la cámara [91].

5.2.3.2.1. Microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM)

El STEM (Scanning transmission electron microscopy) combina los principios de microscopía electrónica de transmisión y de barrido y puede ser utilizado tanto en el SEM como en el TEM. Este microscopio requiere muestras electrotransparentes (espesores inferiores a los 100 nm) y permite ver su microestructura así como evaluar su composición química tal y como se reporta en la Ref. [92].

La técnica de STEM tiene diferentes modos de formación de imagen, en campo claro (*bright field*, BF) y en campo oscuro (*dark field*, DF). En el primer caso, la imagen se forma a partir del haz de electrones transmitido, el cual no sufre dispersión, obteniendo la imagen del objeto oscura sobre un fondo brillante. En el segundo, se usan electrones dispersados, consiguiendo la imagen brillante sobre un

fondo oscuro. Por otro lado, también se pueden obtener diagramas de difracción de la muestra, lo que aporta información sobre su estructura cristalina [93]. Las muestras han sido observadas mediante un detector presente en el FIB/FESEM descrito anteriormente. Las diferentes imágenes se han adquirido con un voltaje de aceleración de 30 kV [94].

Preparación de muestras

El aspecto principal que se debe tener en cuenta es que las muestras tienen que ser lo suficientemente delgadas para permitir que los electrones la puedan atravesar. Existen varios protocolos de preparación en función del tipo de muestra, el medio o el estado en el que se encuentre.

En este caso, puesto que las nanopartículas analizadas se encuentran en disolución, se ha depositado una gota sobre una rejilla de oro de la marca Ted Pella, ver **Figura 42** [95]. Posteriormente, la gota se dejaba secar al aire durante 15 minutos antes de introducir la rejilla de oro en el portamuestras de STEM.

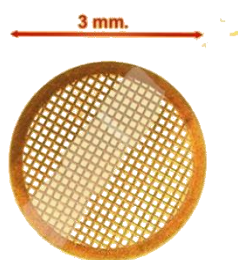


Figura 42 Soporte STEM [95].

Las imágenes fueron posteriormente analizadas utilizando el software OriginPro 8.0.

5.2.3.2.2. Espectroscopia de Rayos X (EDX o EDS)

La espectroscopia de Rayos X (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*, EDX) es una técnica de microanálisis acoplada a los equipos de FESEM, y TEM que permite analizar químicamente la muestra o región de interés. Dicha técnica, permite analizar partículas con unas dimensiones inferiores a la μm .

La técnica detecta los rayos X emitidos por la muestra cuando son bombardeadas por un haz de electrones focalizados para obtener la composición elemental del volumen analizado [96]. Con ello se puede realizar tanto el análisis cualitativo, es decir, la identificación de las líneas del espectro, y el cuantitativo, determinación de las concentraciones de los elementos presentes [97]. En el análisis cualitativo, los valores de energía de rayos X de la muestra se comparan con los valores teóricos y de esta manera detectar la presencia de algún elemento [96]. En el análisis cuantitativo, se miden las

intensidades de línea de cada elemento de la muestra y de los mismos elementos en los estándares de calibración de composición conocida [97].

Esta técnica presenta un conjunto de ventajas (verde) e inconvenientes (rojo); los cuales se citan a continuación:

- El rápido conocimiento de los elementos presentes.
- La versatilidad.
- La economicidad.
- La posibilidad de hacer el análisis cuantitativo en algunas muestras.
- El tamaño de la muestra debe ser compatible con SEM y TEM.
- Las muestras deben ser compatibles con el vacío, por lo tanto, no es ideal para materiales orgánicos húmedos.
- El análisis puede restringir el posterior análisis superficial.
- Pueden existir múltiples superposiciones de picos elementales, por lo que es necesaria una revisión cuidadosa de los espectros [98].

El análisis cuantitativo de las partículas de plata en la muestra de interés, se ha realizado con un detector EDX (Oxford Instruments) acoplado al FIB/FESEM (Zeiss). La distancia de trabajo así como el voltaje se ha mantenido constante a valores aproximados de 10 mm y 30 kV, respectivamente.

Preparación de la muestra

La preparación de las muestras es la misma que en el caso del FESEM o STEM.

Si se utiliza el EDX con muestras del FESEM se debe tener en cuenta que si las muestras son eléctricamente no conductoras, debe aplicarse una capa superficial conductora de carbono evaporado al vacío, ya que tiene una influencia mínima sobre las intensidades de rayos X debido a su bajo número atómico y no añade picos no deseados al espectro de rayos X [97].

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Análisis de rugosidad

El análisis topográfico se ha realizado mediante dos técnicas de caracterización diferentes (AFM e Interferometría). Ambas técnicas permiten analizar la rugosidad de las muestras; el AFM a nivel más local comparado con el microscopio interferométrico.

Con el AFM, se han obtenido imágenes (1 y 5 μm) de los blancos y extremos (menor y mayor cantidad de nitrato de plata)

La **Figura 43**, muestra las imágenes de AFM (imagen de topografía, 3D) para el extracto 3, ya que es la muestra que presenta una mayor cantidad de nanopartículas de plata con unas dimensiones de escaneo de $1 \times 1 \mu\text{m}$ (las demás imágenes se pueden observar en el **Anexo 1**).

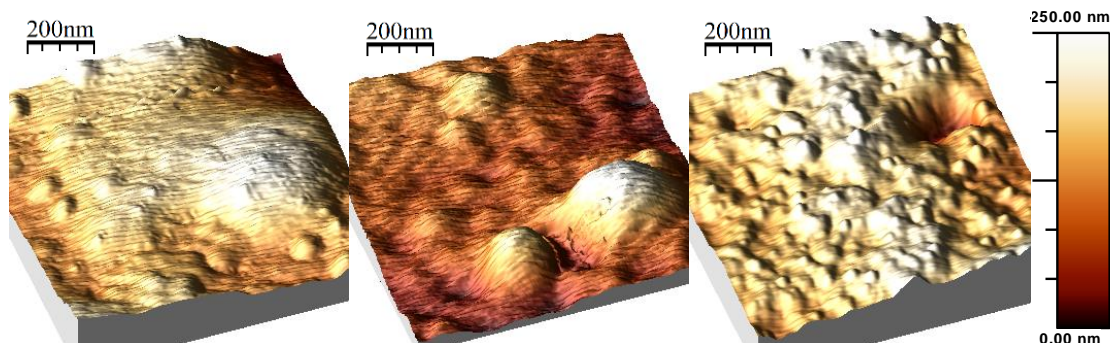


Figura 43 Imagen de topografía (3D) obtenida mediante AFM para el extracto 3. izquierda) muestra blanco (3) centro) muestra 1(3) derecha) muestra 3(3).

Tal como se aprecia en la **Figura 43**, las diferentes imágenes de AFM muestran una topografía heterogénea, presentando regiones esféricas parecidas a las nanopartículas de plata. Sin embargo, las dimensiones de estas nanopartículas son del orden de los 50-300 nm en diámetro, tal y como se puede apreciar en la **Figura 45**. Rango que difiere mucho del esperado. La muestra de la **Figura 43** (derecha), presenta una mayor cantidad de nanopartículas de plata, sin embargo, la imagen de topografía nos muestra una superficie totalmente heterogénea, con valores máximos y mínimos del orden de los 250 nm. Otro aspecto que cabe destacar es que las imágenes son realizadas en un área muy reducida y diferente en cada una de ellas, por lo tanto, según el punto de la muestra elegido para realizar el análisis, se obtendrán unos resultados u otros.

Con el fin de ver la rugosidad de un área mayor, se han realizado escaneos en una área ligeramente mayor, de unas $5 \mu\text{m}$ tal y como se observa en la **Figura 44**. Tal y como se puede apreciar, en ellas se ven ligeras partículas esféricas que cabría pensar que son las nanopartículas de plata. Sin embargo, las dimensiones son del mismo orden que las observadas en la figura anterior.

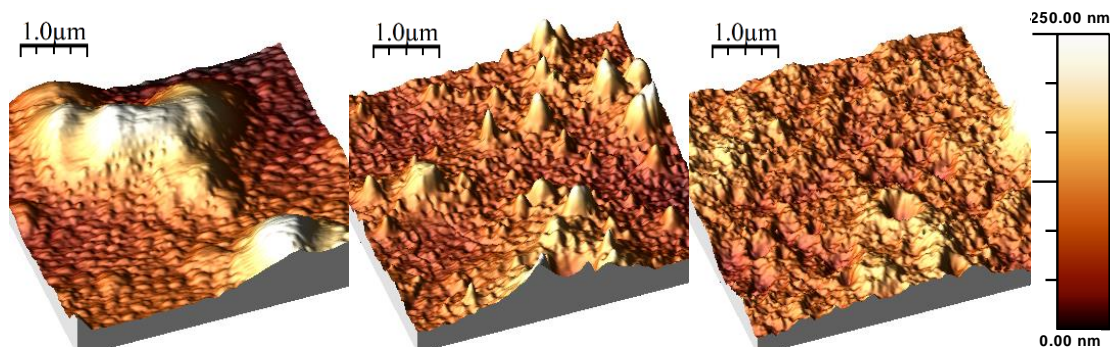


Figura 44 Imagen AFM. izquierda) muestra blanco (3) centro) muestra 1(3) derecha) muestra 3(3).

Si se hace un perfil de la muestra 3(3) (ver **Figura 45**) a través de una de las partículas observadas en la **Figura 44**, se puede apreciar que la diferencia de altura y el ancho de la partícula es de alrededor de los 80 nm y de unas 2 μm . Este resultado, hace pensar que no es una única nanopartícula de plata, sino que tenemos un aglomerado de nanopartículas. Cabe mencionar, que la partícula observada presenta una altura de unos 80 nm, esto se puede deber a que las nanopartículas se solidifican sobre el extracto, midiendo así la altura de ambos materiales. También, los valores del perfil pueden corresponder a fracciones de raspo de uva o aglomeración de partículas.

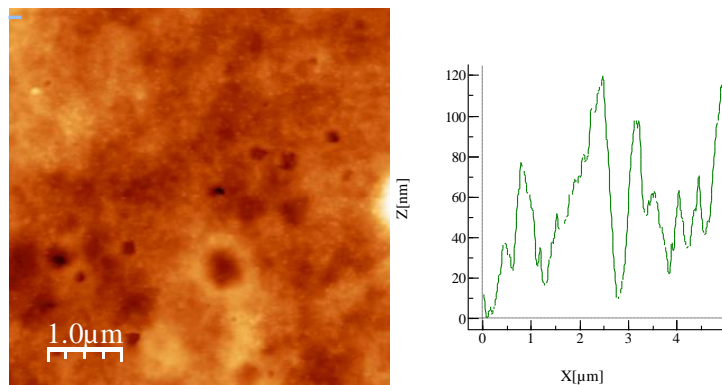


Figura 45 Perfil Z de la muestra 3(3).

Con los resultados se ha podido recalcar el hecho que la técnica de AFM no es la mejor para caracterizar las dimensiones y distribución de las nanopartículas de plata, ya que es una técnica muy local. A continuación, se muestran los resultados obtenidos mediante la observación de una mayor superficie del material por interferometría óptica.

En el caso de la interferometría se han realizado imágenes de todas las muestras. La **Figura 46**, muestran una imagen de topografía obtenida por interferometría para la muestra 3 (las demás imágenes para las distintas muestras se encuentran en el **Anexo 2**).

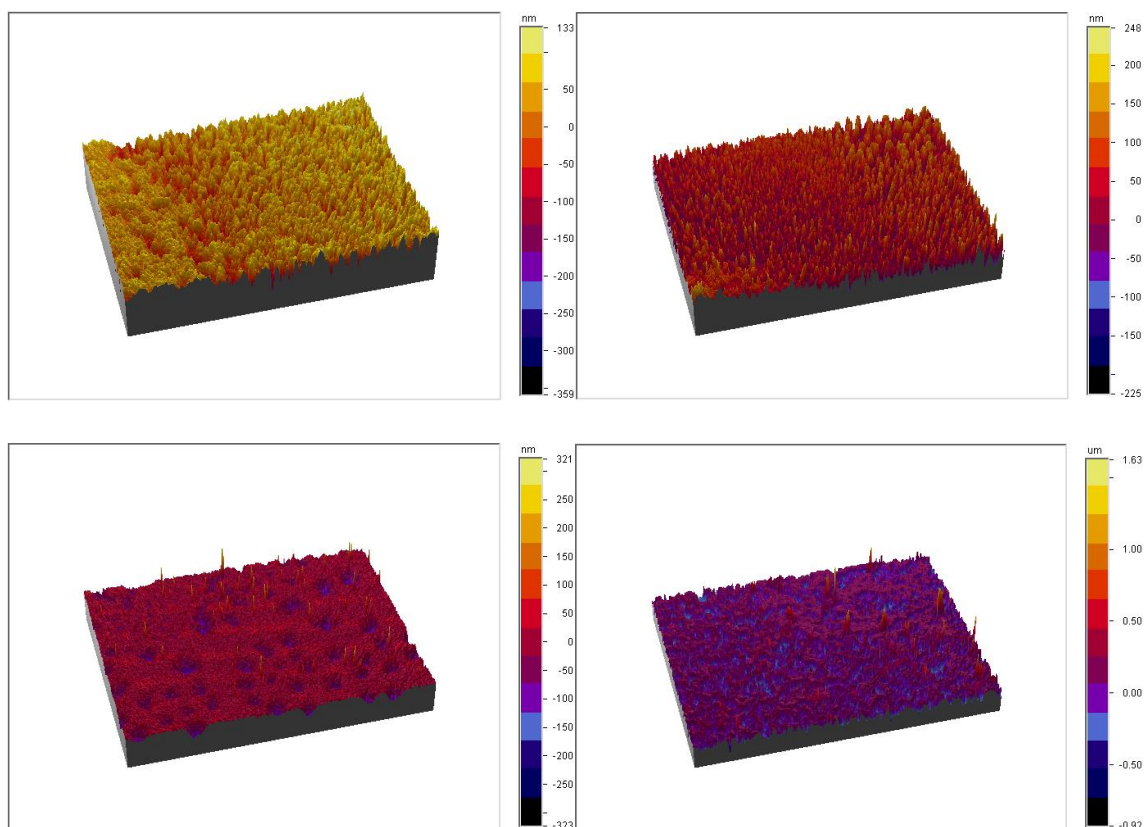


Figura 46 Imagen de Interferometría. (izquierda-arriba) muestra blanco (3) (derecha-arriba) muestra 1(3) (izquierda-abajo) muestra 3(2) (derecha-abajo) muestra 3(3).

Tal y como se ha observado anteriormente, las imágenes de interferometría permiten visualizar de una manera más global una mayor región de estudio. Sin embargo, la resolución de dicha técnica no es suficiente para poder observar y determinar el tamaño de las nanopartículas de plata heterogéneamente distribuidas en el extracto, tal y como se muestra en la **Figura 46**. También, realizando un perfil en la dirección vertical (perfil azul, **Figura 47**) como en la horizontal (perfil rojo, **Figura 47**), se puede observar en ambas figuras que los coloides tienen una altura muy superior a 100 nm. Esta observación, pone de manifiesto que esta técnica no nos permite observar de manera local las nanopartículas de plata, sino la observación de sus aglomerados o mezcla de raspo de uva y nanopartículas.

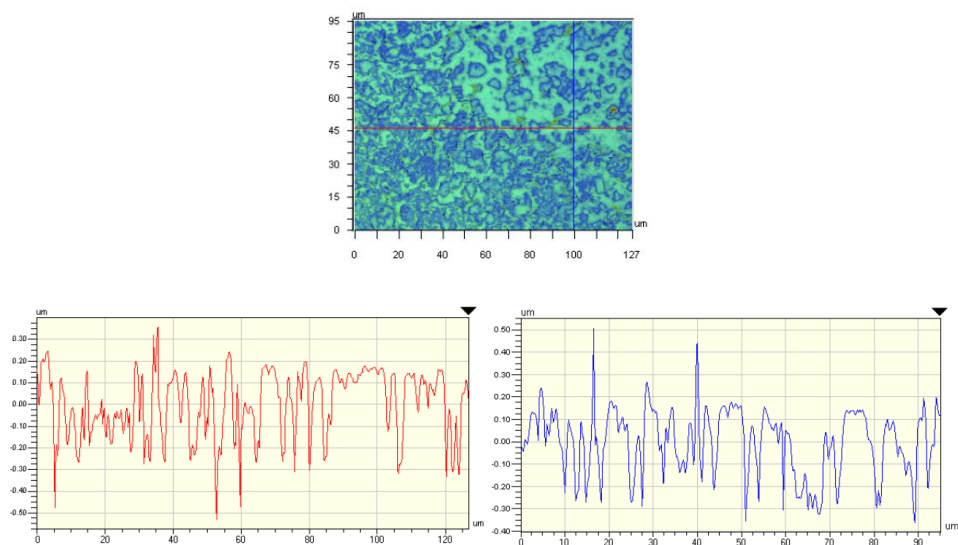


Figura 47 Perfil Z de la muestra 3(3). derecha) Perfil en X izquierda) Perfil en Y.

Tal como se ha presentado a lo largo de esta sección, ambas técnicas no nos permiten determinar ni la geometría ni las dimensiones de las nanopartículas de plata. Únicamente, nos permiten realizar una observación visual de su morfología. En las **Tablas 12 y 13**, se puede observar el análisis de rugosidad. Principalmente, se puede apreciar la rugosidad media (R_a) y la RMS medida por ambas técnicas.

Tabla 12 Tabla comparativa de los valores de R_a determinados por AFM e interferometría.

Muestra	AFM (nm)		Interferometría (nm)
	1μm	5μm	
Blanco (1)	7,44	9,08	49,5
1(1)	13,5	26,2	314,9
2(1)	-	-	21,9
3(1)	5,95	13,9	22,9
Blanco (2)	5,03	25,7	44,2
1(2)	4,73	20,4	117,8
2(2)	-	-	63,7
3(2)	7,72	11,9	117,7
Blanco (3)	5,69	29,3	43,8
1(3)	3,17	5,85	47,9
2(3)	-	-	20,6
3(3)	11,2	20,8	137,3

Tabla 13 Tabla comparativa de los valores de RMS determinados por AFM e interferometría.

Muestra	AFM (nm)		Interferometría (nm)
	1um	5um	
Blanco (1)	9,33	12,2	62,6
1(1)	16,3	32,5	405,7
2(1)	-	-	33,1
3(1)	7,44	17,7	39,3
Blanco (2)	6,24	34,6	52,4
1(2)	6,06	25,8	136,0
2(2)	-	-	96,4
e3(2)	9,63	15,2	138,3
Blanco (3)	7,16	36,7	54,5
1(3)	4,15	7,87	58,5
2(3)	-	-	28,9
3(3)	15,0	26,6	163,4

Tal como se puede apreciar, el interferómetro reporta valores mayores de R_a y RMS que los valores encontrados por AFM. Esta divergencia, se atribuye a que la técnica de AFM es mucho más local que el interferómetro y permite caracterizar zonas más planas que el interferómetro. Por consiguiente, el AFM no es una técnica adecuada para caracterizar muestras altamente heterogéneas.

5.3.2. Microscopía electrónica

En primero lugar, las muestras fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido de alta resolución (FESEM), concretamente, las pertenecientes al extracto 2 y 3 puesto que contenían más nanopartículas (las imágenes de FESEM, para todas las muestras estudiadas en este trabajo final de grado, se encuentran en el **Anexo 3**).

En las **Figura 48** se pueden ver las microfotografías de las muestras del extracto 2. Tal y como se pueden observar en estas imágenes, la densidad de nanopartículas de plata es máxima para la muestra 3(2).

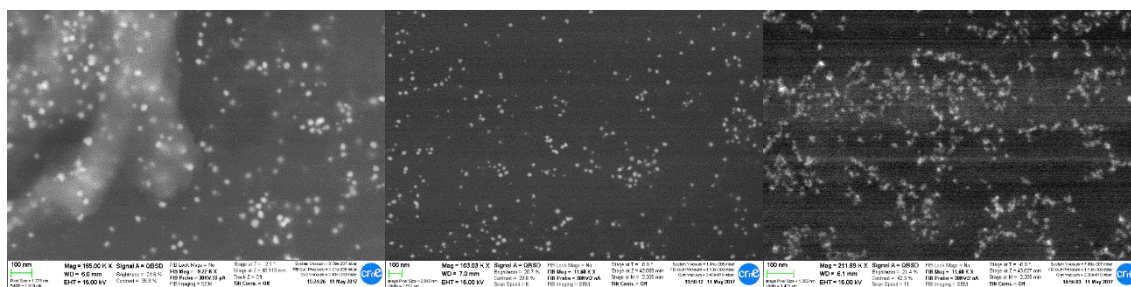


Figura 48 Micrografía obtenida por FESEM (izquierda) muestra 1(2) (centro) muestra 2(2) (derecha) muestra 3(2).

En todas las imágenes se puede corroborar la existencia de nanopartículas, las cuales aparecen de color blanco. En cuanto a la morfología, existen diversas formas de coloides, los que más aparecen son perfiles triangulares y circulares, como se ve en la **Figura 49**. La proporción de partículas al aumentar la cantidad de plata, es una característica que no se puede discutir de forma objetiva ya que no se añadió de manera exacta la muestra en el soporte, es decir, cuantificando la cantidad añadida al soporte.



Figura 49 Morfología de las nanopartículas en FESEM.

Puesto que la preparación de las muestras conlleva un proceso de solidificación debido a que éstas se encuentran en un estado inicial líquido, las nanopartículas se distribuyen de manera heterogénea. Dicho suceso provoca el efecto que se puede ver en la **Figura 48** (derecha) en la cual se distingue la existencia de nanopartículas pero no se ven de forma diferenciada las unas con las otras para saber sus dimensiones. Esto lleva a la conclusión que el microscopio electrónico de barrido no es la técnica más idónea para conocer el tamaño de los coloides.

En segundo lugar, para verificar la existencia de nanopartículas de plata, se ha realizado un espectro con EDX tanto con las muestras del FESEM como las observadas por STEM, ver **Figuras 50 y 51**, respectivamente.

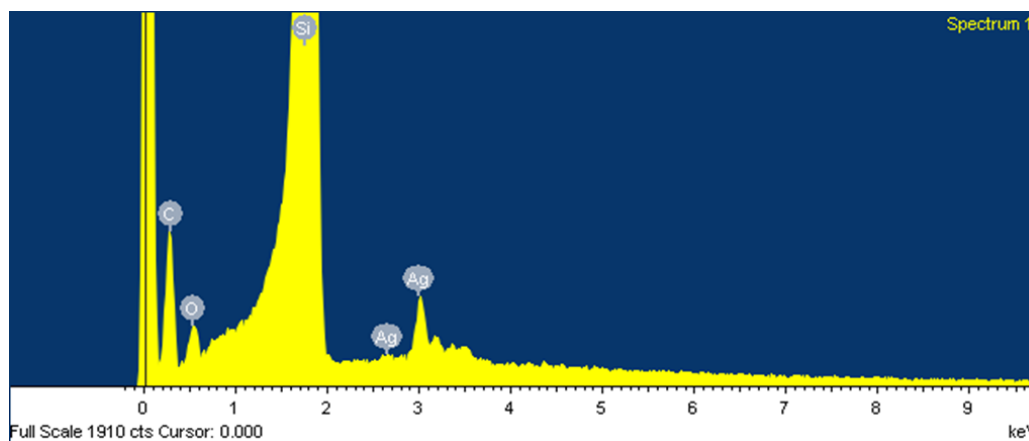


Figura 50 Espectro Rayos X con muestra de FESEM.

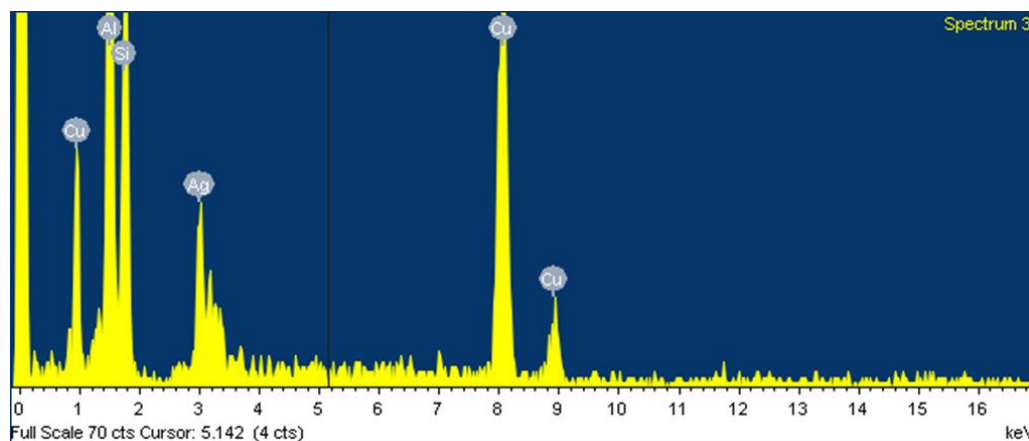


Figura 51 Espectro Rayos X con muestra de STEM.

Aunque en ambas figuras predomina el elemento del cual está hecho el soporte, siendo cobre en el caso del STEM y de silicio en caso del FESEM, queda reflejada la existencia de plata en ambas muestras. La **Figura 52**, la cual corresponde a una muestra del microscopio electrónico de transmisión, muestra la existencia de otros elementos como carbono, oxígeno o potasio, los cuales aparecen ya que se encuentran en el raspo de uva [44].

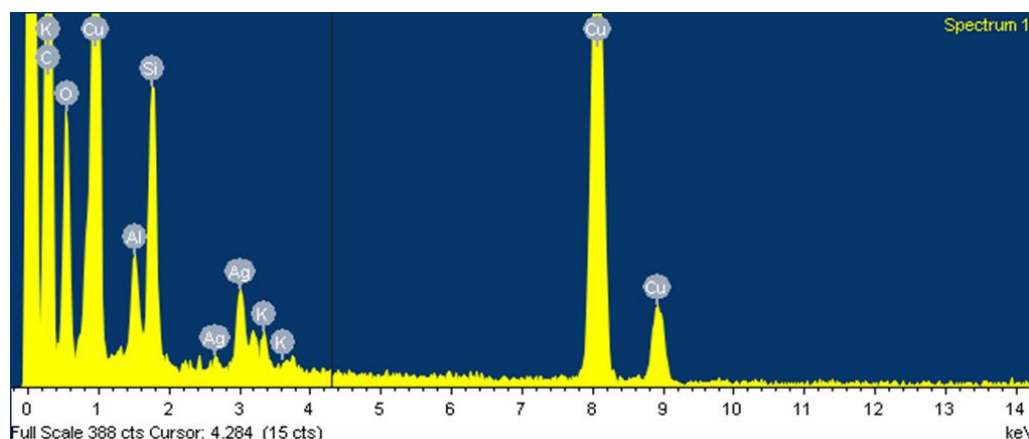


Figura 52 Espectro de Rayos X con muestra de STEM.

Para finalizar el análisis, se empleó el detector de STEM acoplado al FIB/FESEM. Con él se estudiaron los extremos de cada extracto, es decir, las muestras con la cantidad mínima y máxima de plata, ver **figuras 53 y 54**.

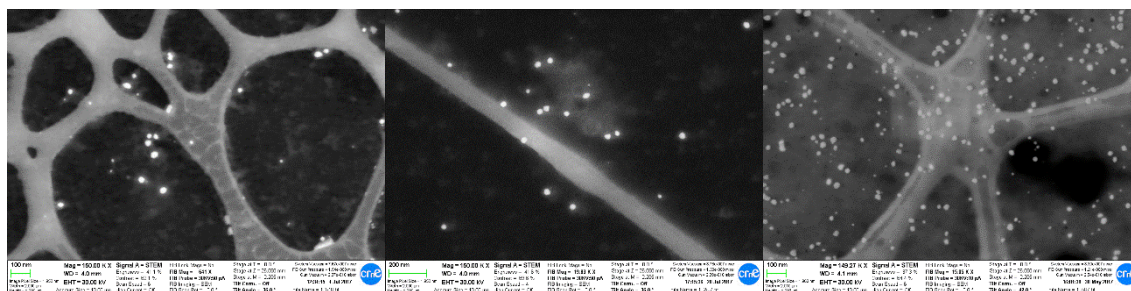


Figura 53 Imagen de STEM. izquierda) muestra 1(1) centro) muestra 1(2) derecha) muestra 1(3).

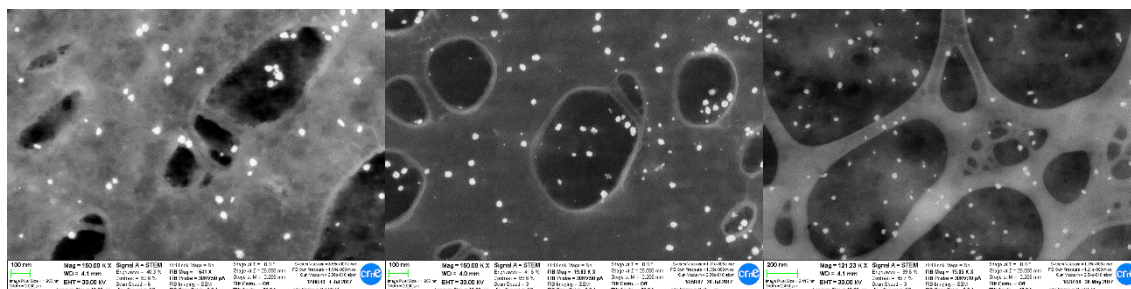


Figura 54 Imagen de STEM. izquierda) muestra 3(1) centro) muestra 3(2) derecha) muestra 3(3).

Posteriormente, mediante análisis de imagen (utilizando Image J), se ha determinado el tamaño de las partículas de todas las micrografías STEM. Por cada muestra, se ha contabilizado un mínimo de 500-600 partículas por muestra. Posteriormente, los valores han sido representados en forma de histograma el diámetro de las nanopartículas de plata utilizando el programa Origin 8.0. La **Figura 55** representa los histogramas de cada extracto (en rojo).

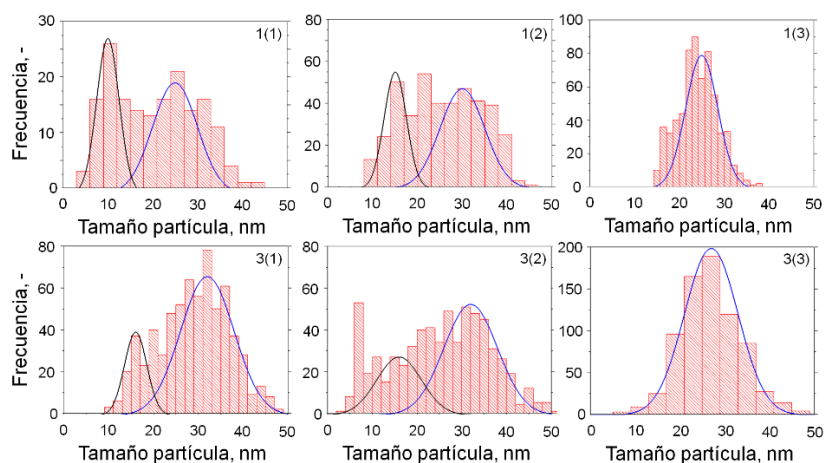


Figura 55 Histograma STEM.

En primer lugar, destacar la distribución de los datos en cada representación. Para los extractos 1 y 2, los histogramas presentan una distribución bimodal del tamaño de partículas de plata, es decir, existen

dos diámetros, uno pequeño y uno grande. Por lo contrario, en el extracto 3 solo existe una distribución monomodal. Estos hechos quedan representados en la **Tabla 14**.

Tabla 14 Tamaño de partícula STEM.

Muestra	Tamaño de partícula fino (nm)	Tamaño de partícula grueso (nm)
1(1)	10 ± 5	25 ± 10
1(2)	10 ± 5	25 ± 10
1(3)	-	25 ± 10
3(1)	16 ± 5	32 ± 12
3(2)	16 ± 10	32 ± 12
3(3)	-	27 ± 12

Observando la tabla se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- En el extracto 3 predominan las nanopartículas con un tamaño mayor. En el 1 y 2, en cambio, existen tanto finas como gruesas.
- Con la menor cantidad de plata adicionada al extracto (muestras 1(1), 1(2) y 1(3)) se observa que las dimensiones de partícula gruesa son iguales en todos los tipos de extracto ($25 \pm 10\text{nm}$).
- Con la cantidad máxima de plata adicionada, se obtienen partículas ligeramente de menor tamaño utilizando el tercer extracto ($27 \pm 12\text{nm}$).

Por lo tanto, con todos los resultados examinados, se puede extraer la conclusión final de que la mejor técnica para caracterizar las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extracto de raspo de uva es el STEM, ya que nos permite visualizarlas y cuantificarlas de una manera clara y rápida.

Conclusiones

Con la realización del presente trabajo de fin de grado, y siguiendo los objetivos planteados, se ha llegado a las conclusiones que se citan a continuación:

- La concentración de polifenoles y azúcares reductores obtenidos en los extractos en función del tiempo de reflujo no fue muy diferente por lo que no es necesario utilizar un tiempo de reflujo de más de 10 minutos para preparar un extracto con una cantidad adecuada de polifenoles y azúcares reductores para sintetizar nanopartículas de plata. Por otro lado, comparando los extractos según los métodos utilizados post-filtración (centrifugación o filtración con jeringa y filtro de 0,2 μm), se ha observado que el primero es más óptimo para eliminar el sólido remanente, ya que la concentración de polifenoles obtenida es mayor.
- En la síntesis de nanopartículas de plata a partir del extracto de raspo de uva se ha comprobado mediante espectroscopia de UV-Vis que cuanto más cantidad de disolución de Ag^+ se añade al extracto mayor cantidad de nanopartículas se obtienen. También, se ha observado un desplazamiento del máximo de absorción hacia la derecha del espectro UV-Visible, es decir, hacia longitudes de onda cada vez mayores lo que indica tamaño mayor del diámetro de las nanopartículas.
- Empleando microscopía de fuerza atómica e interferométrica para caracterizar la morfología del raspo de uva y nanopartículas de plata sintetizadas, se ha observado que ambas muestras son heterogéneas y no son adecuadas para ser analizadas por este tipo de técnicas. Concretamente, se ha observado que el raspo de uva presenta regiones esféricas, las cuales podrían ser confundidas con nanopartículas. También, en las muestras que contenían plata, se ha medido el diámetro de las nanopartículas y éste era muy superior del esperado, corroborando así la inadecuación de dichas técnicas para su análisis de rugosidad. Comparando todos los resultados obtenidos con las distintas técnicas microscópicas avanzadas de caracterización, se puede concluir que la técnica de microscopía más óptima para determinar el tamaño y distribución de las nanopartículas de plata es la microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM). A partir de dicho análisis, se ha observado que utilizando el extracto obtenido con mayor tiempo de reflujo (1h) se forman nanopartículas sólo con un tamaño de partícula, el más grueso (25-27 nm) de los detectados. En cambio, cuando se utilizan los extractos obtenidos con menores tiempo de reflujo se muestra una distribución bimodal de nanopartículas, es decir, tanto de tamaños finos (10-16 nm) como grueso (25-32nm).

Líneas futuras

Para continuar o ampliar la investigación del presente TFG, se plantean varios puntos que pueden ser materia de futuros proyectos.

En primer lugar, por lo que hace el extracto de raspo de uva y nanopartículas de plata, se puede encontrar una mejor vía de obtención, la cual sea más verde. Por ejemplo, respecto a la preparación del extracto, se puede realizar a una menor temperatura de reflujo, o a un tamaño mayor, utilizando así, menos tiempo el molinillo. En cuanto a las nanopartículas, éstas podrían ser preparadas empleando menor tiempo o temperatura en el baño de agua termostático.

Otra posibilidad sería la comprobación de los resultados obtenidos y poder, así, sacar mejores conclusiones puesto que se ha realizado una réplica de cada método y extracto. Un aspecto que se puede corroborar, por ejemplo, es que con el segundo método se formen más nanopartículas de plata, ya que, como se ha visto, éste tiene menos polifenoles que el primero.

Una tercera línea sería el estudio, con más profundidad, de las diferentes técnicas de caracterización de nanopartículas. Existen aspectos, como el ángulo empleado en Interferometría, el cual se puede modificar y encontrar cuál sería el óptimo para analizar las muestras. También, se pueden analizar las nanopartículas o extracto con otras técnicas que no se han utilizado en este trabajo

Por último, se podría realizar el estudio de nanopartículas empleando otros metales o también, preparar el extracto con otro compuesto.

6. Bibliografía

- [1] Han, T. T., Mcgilvery, C. M., Yang, L., Calder, L., Subramaniam, P., Lee, K., Mainelis, G. (2017). Release of airborne particles and Ag and Zn compounds from nanotechnology-enabled consumer sprays: Implications for inhalation exposure, 155, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2017.02.016>.
- [2] Abdo Saleh, Tawfik & Kumar Gupta, Vinod. (2016). *Nanomaterial and Polimer Membranes*. Amsterdam: Elsevier.
- [3] European Comission. (2016). *Nanomaterials*. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/index_en.htm [visitado 06-03-17].
- [4] Europea Comission. (2009). *Nanomaterials*. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/nanomaterials/en/index.htm#6 [visitado 06-03-17].
- [5] Skwarczynski, Mariusz & Toth, Istvan. (2017). *Micro and Nanotechnology in Vaccine Development*. Amsterdam: Elsevier.
- [6] Nano Science, Technology and Scoreboard. (2014). *Which nanomaterials have been studied more?*. 1–5.
- [7] Toshima, N. (2003). Recent Progress in Applications of Ligand-Stabilized Metal Nanoclusters. *Macromol. Symp*, 204, 219–226. <https://doi.org/10.1002/masy.200351418>
- [8] Panigrahi, S., Kundu, S., Ghosh, S. K., Nath, S., & Pal, T. (2004). General method of synthesis for metal nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 6, 411–414.
- [9] Campelo, J. M., Luna, D., Luque, R., Marinas, J. M., & Romero, A. A. (2009). Sustainable Preparation of Supported Metal Nanoparticles and Their Applications in Catalysis. *Chemsuschem*, 2, 18–45. <https://doi.org/10.1002/cssc.200800227>
- [10] Ghorbani, H. R. (2014). A Review of Methods for Synthesis of Al Nanoparticles. *Oriental Journal of Chemistry*, 30(4), 1941–1949.
- [11] Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(2), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002>
- [12] Torralba Cadena, Lourdes de Jesús. (2017). *Estudio de la modificación de electrodos comerciales serigrafados de nanofibras de carbono, con nanopartículas de plata para la detección de Pb²⁺ y Cd²⁺ en disoluciones acuosas*. Barcelona.
- [13] Wang, Y., & Xia, Y. (2004). Bottom-Up and Top-Down Approaches to the Synthesis of Monodispersed Spherical Colloids of Low Melting-Point Metals. *Nano Letters*, 4(10), 2047–2050.

- [14] Charinpanitkul, T., & Faungnawakij, K. (2008). Review of Recent Research on Nanoparticle Production in Thailand. *Advanced Powder Technology*, 19(5), 443–457. [https://doi.org/10.1016/S0921-8831\(08\)60911-5](https://doi.org/10.1016/S0921-8831(08)60911-5)
- [15] Huang, L. Z., Kien, C. S., Ismail, I., Song, T. K., Liew, J., & Chyi, Y. (2017). Structural Transformations of Mechanically Induced Top-down Approach BaFe₁₂O₁₉ Nanoparticles Synthesized from High Crystallinity Bulk Materials. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2017.01.036>
- [16] Cao, Guozhong. (2004). *Nanostructures and nanomaterials*. Londres: Imperial College Press.
- [17] *Photolithography steps*. <http://galleryhip.com/photolithography-steps.html> [visitado 07-03-17].
- [18] Rius Suñé, Gemma. (2008). *Electron beam lithography for Nanofabrication*. Barcelona.
- [19] Alom, S., Chen, C. S., & Chen, C. S. (2007). Microcontact printing : A tool to pattern. *The Royal Society of Chemistry*, 3, 1–11. <https://doi.org/10.1039/b613349e>
- [20] Elve Flow. *Introduction about PDMS soft-lithography and polymer molding for microfluidics*. <http://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/soft-lithography-reviews-and-tutorials/introduction-in-soft-lithography/introduction-about-soft-lithography-and-polymer-molding-for-microfluidic/>
- [21] Chou, S. Y., Krauss, P. R., & Renstrom, P. J. (1996). Nanoimprint lithography. *American Vacuum Society*, 14, 4129–4133.
- [22] Colson, P., Henrist, C., & Cloots, R. (2013). Nanosphere Lithography : A Powerful Method for the Controlled Manufacturing of Nanomaterials. *Journal of Nanomaterials*, 2013.
- [23] Stephanopoulos, N., Ortony, J. H., & Stupp, S. I. (2013). Self-assembly for the synthesis of functional biomaterials. *Acta Materialia*, 61(3), 912–930. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2012.10.046>
- [24] Sigma Aldrich Corporation. (2006). *Molecular Self-Assembly*. USA: Aldrich.
- [25] H. Chaki, S., P.Trivedi, D., P.Tailor, J., D. Claudhary, M., & Mahato, K. (2013). Wet chemical synthesis and characterization of SnS₂ nanoparticles. *Appl Nanosci*, 3, 189–195. <https://doi.org/10.1007/s13204-012-0123-7>
- [26] Malik, M. A., Younus, M., & Hashim, M. A. (2012). Microemulsion method : A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials. *Arabian Journal of Chemistry*, 5(4), 397–417. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.09.027>
- [27] *Sol-Gel Method*. <https://es.scribd.com/document/263950659/Sol-Gel-Method> [visitado 17-03-17].
- [28] Fan, Zhang. (2015). *Photon Upconversion Nanomaterials*. Alemania: Springer-Verlag.

- [29] L. Chandler, David. (2015). *Explained: chemical vapor deposition*.
<http://news.mit.edu/2015/explained-chemical-vapor-deposition-0619> [visitado 03-04-17].
- [30] Huánuco Ramos, Aarón. (2015). *Estudio de la recuperación de metales mediante la síntesis de nanopartículas metálicas*. Barcelona.
- [31] M. Ramya & M. Sylvia Subapriya. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*.
- [32] Kaler, Abhishek; Patel, Navin & Chand Banerjee, Uttam. (2010). *Green synthesis of silver nanoparticles*. India.
- [33] Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156(1–2), 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.02.001>
- [34] Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., & Zhang, Z. (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1650–1662.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.001>
- [35] Huang, H., & Yang, X. (2004). Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles : a green method. *Carbohydrate Research*, 339, 2627–2631.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.08.005>
- [36] *Heparin General Structure*.
https://es.wikipedia.org/wiki/Heparina#/media/File:Heparin_General_Structure_V.1.svg
[visitado 04-04-17].
- [37] Benet, W. E., Lewis, G. S., Yang, L. Z., & Hughes, D. E. P. (2011). The mechanism of the reaction of the Tollens reagent. *Journal of Chemical Research*, 675–677.
- [38] Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 385–406.
- [39] Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas : controlando forma y tamaño. *Mundo Nano*, 5(1), 69–81.
- [40] Leyva, Ana Gabriela. (2007). *Síntesis y caracterización de nano-estructuras de óxidos de metales de transición*. República Argentina.
- [41] De La Garza Galván, María de Jesús. (2013). *Química Hoy*. México.
- [42] Cheng, Y., Zheng, J., Wang, Z., & Liu, L. (2011). New method for preparation of polyoxometalate-capped gold nanoparticles , and their assembly on an indium-doped tin oxide electrode. *Microchim Acta*, 529–535. <https://doi.org/10.1007/s00604-011-0589-0>.
- [43] Pujol, D., Liu, C., Fiol, N., Olivella, M. À., & Gominho, J. (2012). Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 42, 209-.

- [44] Pujol, D., Liu, C., Fiol, N., Olivella, M. À., Gominho, J., Villaescusa, I., & Pereirac, H. (2013). Chemical characterization of different granulometric fractions of grape stalks waste. *Industrial Crops and Products*, 50, 494–500.
- [45] Nualart Sanjuán, Sílvia. (2009). *Aplicación de la técnica de la potenciometría de inyección de flujo (FIP) para la monitorización de procesos de biosorción del ión Cu (II) en raspo de uva*. Barcelona.
- [46] *Raspo de uva*. https://www.vinook.it/uva-e-vitigni/uva/raspo-uva_M1.jpg [visitado 16-04-17].
- [47] E.Beltran, X. Sort, M. Soliva, I. Trillas. (2004). Composting winery waste: sludges and grape stalks. *Bioresource Technology*, 95 (2), 203-208.
- [48] Souquet, Jean-Marc; Labarbe, Benoît; Le Guernevé, Christine; Cheynier, Véronique & Moutounet, Michel. (2000). Phenolic Composition of Grape Stems. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (4), 1076–1080.
- [49] Seguí Picazo, Isaac. (2007). *Valorización de la raspo de uva como bioadsorbente para la eliminación de Cobre y Níquel de efluentes acuosos*. Barcelona
- [50] Krishnaswamy, Kiruba; Vali, Hojatollah & Orsat, Valérie. (2014). Value-adding to grape waste: Green synthesis of gold nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 142. 210-220.
- [51] V. Kharissova, Oxana; H.V. Dias, Rasika; I. Kharisov, Boris; Olvera Pérez, Betsabee & Jiménez Pérez, Victor M. (2013). *The greener synthesis of nanoparticles*. México.
- [52] Quiñones, M., & Aleixandre, M. M. A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- [53] Rico-Moctezuma, A., Vilchis-Nestor, A. R., & Sánchez-Mendieta, V. (2010). Biosíntesis de nanopartículas de oro mediante el extracto de *Opuntia ficus-indica*. *Superficies Y Vacío*, 23, 94–97.
- [54] Song, X., Yu, S., Jin, G., Wang, X., & Chen, J. (2016). Plant Polyphenol-Assisted Green Synthesis of Hollow CoPt Alloy Nanoparticles for Dual-Modality Imaging Guided Photothermal Therapy. *Materials View*, (11), 1506–1513. <https://doi.org/10.1002/sml.201503250>.
- [55] Iravani, S. (2011). Green Chemistry Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13, 2638–2650. <https://doi.org/10.1039/c1gc15386b>
- [56] García Martínez, Eva; Fernández Segovia, Isabel & Fuentes López, Ana. *Determinación de polifenoles totales por el método de FolinCiocalteu*. Valencia.
- [57] *Método Folin Ciocalteu*. <https://documents.mx/documents/metodo-folin-ciocalteu.html> [visitado 20-05-17].

- [58] L. Singleton, Vernon; Orthofer, Rudolf & Lamuela-Raventós, Rosa M. (1974). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in enzymology*, 299. 152-178.
- [59] Laarbi, Omar. (2016). *Procedimientos de trabajo en un laboratorio de biosorción de metales y monitorización de procesos*. Barcelona
- [60] Gerits, Nathalie. (2015). *Synthesis of copper nanoparticles using grape stalk and spent coffee extract*. Girona.
- [61] Aherne, B. D., Ledwith, D. M., Gara, M., & Kelly, J. M. (2016). Optical Properties and Growth Aspects of Silver Nanoprisms Produced by a Highly Reproducible and Rapid Synthesis at Room Temperature. *Advanced Functional Materials*, 18, 2005–2016.
<https://doi.org/10.1002/adfm.200800233>
- [62] Aherne, Damian; M. Ledwith, Deirdre; Gara, Matthew & M. Kelly, John. (2008). Optical properties and growth aspects of silver nanoprisms produced by a highly reproducible and rapid synthesis at room temperature. *Advanced functional materials*, 18. (24). 2001-2134.
- [63] Huánco Ramos, Aarón Miguel. (2017). *Estudio de la recuperación de metales mediante la síntesis de nanopartículas metálicas: Cu*. Barcelona.
- [64] *Reducing Sugars*. <http://web.wvcc.edu/ruthrusso/files/2011/05/Reducing-Sugars2.pdf>
[visitado 10-09-17].
- [65] Mehta, Akul. (2011). *Introduction to the Electromagnetic Spectrum and Spectroscopy*.
<http://pharmaxchange.info/press/2011/08/introduction-to-the-electromagnetic-spectrum-and-spectroscopy/> [visitado 03-08-17].
- [66] *Espectrometría de absorción*. http://www.espectrometria.com/espectrometra_de_absorcin
[visitado 12-08-17].
- [67] *Espectrometría ultravioleta-visible*.
http://www.espectrometria.com/espectrometra_ultravioleta-visible [visitado 12-08-17].
- [68] *Electromagnetic spectrum*.
<http://1.bp.blogspot.com/BBRxoDvSpz8/UqaeWD0kGfI/AAAAAAAAAftg/4TTB4giNixk/s1600/pharmatutor-art-2078-1.png> [visitado 13-08-17].
- [69] *Espectrofotómetro*.
<http://proyectodecalibracion.blogspot.com.es/2011/11/espectrofotometro.html>
[visitado 13-08-17].
- [70] Morales, J., Morán, J., Quintana, M., & Estrada, W. (2009). SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR LA RUTA Sol-GeI A PARTIR DE NITRATO DE PLATA

- SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SILVER NANOPARTICLES BY Sol-Gel ROUTE FROM SILVER NITRATE. *Rev Soc Quim Perú*, 75(2), 177–184.
- [71] Calle, L. C., & Londoño, M. E. (2014). Síntesis verde de nanopartículas de plata mediante el uso del ajo (*Allium sativum*). *Revista Soluciones de Postgrado*, 12, 126–137. <https://doi.org/10.14508/sdp.2014.6.12.126-137>
- [72] Cruz, D. A., Rodríguez, M. C., López, J. M., Herrera, V. M., Orive, A. G., & Creus, A. H. (2012). NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y PLASMONES DE SUPERFICIE : UNA RELACIÓN PROFUNDA. *Avances En Ciencias E Ingeniería*, 3(2), 67–78.
- [73] Hinojosa Rivera, Moisés & Reyes Melo, Martín Edgar. (2001). La rugosidad de las superficies: Topometría. *Ingenierías*, Vol. IV. 27-33.
- [74] Gleb, Sapunenko. (2013). *Correlation between the microstructure and the mechanical properties of ceramic composites*. Barcelona.
- [75] Vinco. *Définition technique*. https://www.vinco.es/fr/feuillard/définition_technique/ [visitado 17-08-17].
- [76] F. Shackelford, James. (1998). *Introducción a la ciencia de materiales para ingenieros*. Madrid: Prentice Hall Iberia.
- [77] Research, Reviews and Comparisons. *The Atomic Force Microscope (AFM)*. <http://www.microscopemaster.com/atomic-force-microscope.html> [visitado 18-08-17].
- [78] *Microscopía de fuerza atómica*. http://ocw.uc3m.es/ciencia-e-oin/microscopia-de-fuerza-atmica/otros-recursos-1/Apuntes_STM_y_AFM_00.pdf [visitado 18-08-17].
- [79] *Microscopía de Efecto Túnel y Fuerza Atómica*. <http://www.uco.es/~iq2sagrl/TranspTema9.pdf> [visitado 19-08-17].
- [80] *AFM Cantilever*. https://thetuzaro.files.wordpress.com/2012/03/afm_used_cantilever_in_scanning_electron_microscope_magnification_1000x.jpg [visitado 19-08-17].
- [81] Vladimir Valle Alvarez, Lauro. (2013). *Fatigue behavior and associated binder deformation mechanisms in WC-Co cemented carbides*. Barcelona.
- [82] I. Horcas, R. Fernandez, J.M. Gomez-Rodriguez, J. Colchero, J. Gomez-Herrero & A.M. Baro. (2007). *Review of Scientific Instruments*.

- [83] Infraestructura del Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería Multiescala de Barcelona. <http://multiscale.upc.edu/es/infraestructura-1> [visitado 21-08-17].
- [84] Padilla Sánchez, José Antonio. (2016). *Desarrollo, obtención y optimización de sustratos metálicos de base cobre texturizados biaxialmente para aplicaciones de alto valor tecnológico*. Barcelona.
- [85] *Interferometer*. <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e7/Interferometer.svg> [visitado 01-09-17].
- [86] Ampliación de Química Inorgánica. (2004). *Microscopía electrónica*. http://webdeptos.uma.es/qicm/Doc_docencia/Tema14_me.pdf [visitado 01-09-17].
- [87] *El microscopio electrónico de barrido SEM*. <http://www.pardell.es/microscopia-de-barrido--sem.html> [visitado 01-09-17].
- [88] López Moreno, Daniel. (2016). *Impressió 3D de materials ceràmics base zircònia per aplicacions dentals*. Barcelona.
- [89] Thaller, Maxime. (2016). *Propiedades mecánicas, coeficiente de fricción y efectos de anisotropía mecánica local en aleaciones metálicas*. Barcelona.
- [90] Moreno Fina, Albert. (2016). *Caracterització microestructural i mecànica de multicapes base zirconia per impressió 3D*. Barcelona.
- [91] ThermoFisher Scientific. *An Introduction to Electron Microscopy*. <https://www.fei.com/introduction-to-electron-microscopy/stem/> [visitado 02-09-17].
- [92] *Microscopía electrónica*. <http://www2.uned.es/cristamine/mineral/metodos/tem.htm> [visitado 05-09-17].
- [93] *Why STEM not TEM?* [http://www.spectral.se/spectral.nsf/f164f3e9b82f0febc1256dcc004611c1/d4a98a973f4e0290c12571e300376e06/\\$FILE/208%20Why%20STEM%20Not%20TEM.pdf](http://www.spectral.se/spectral.nsf/f164f3e9b82f0febc1256dcc004611c1/d4a98a973f4e0290c12571e300376e06/$FILE/208%20Why%20STEM%20Not%20TEM.pdf) [visitado 05-09-17].
- [94] *Transmission electron microscopy*. https://en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron_microscopy [visitado 06-09-17].
- [95] Materials Evaluation and Engineering, Inc. (2001). *Handbook of Analytical Methods for Materials: Practical Solution to Materials Problems through Technology and Innovation*. Inglaterra.

[96] *Introduction to Energy Dispersive X-ray Spectrometry (EDS)*.

<http://cfamm.ucr.edu/documents/eds-intro.pdf> [visitado 10-09-17].

[97] EAG Laboratories. *Energy Dispersive Spectroscopy (EDS)*. <http://www.eag.com/energy-dispersive-x-ray-spectroscopy-eds/> [visitado 10-09-17].